COUNTWAY LIBRARY
HC 6EBH

BOSTON
MEDICAL LIBRARY
8 THE FENWAY

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

UND

PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN

HERAUSGEGEBEN VON

DR. F. BÜCHNER
PROFESSOR DER PATHOLOGIE
FREIBURG i. Br.

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. O. RIESSER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT a. M.

206. BAND

MIT 257 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

SPRINGER-VERLAG

1949

BOSTON
DEC 15
MEDICAL LIBRARY

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany

CATALOGUED
DEC
A. B.

Inhalt des 206. Bandes.

Seite

Auffarth, Frieda s. **Ernst Huf.**

Bänder, Alfred, Die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Atemfrequenz und ihre Beeinflussung durch Narkotika bzw. Hypnotika bei der weißen Maus. Mit 7 Textabbildungen 619

Barfuß, Franz†, und **Oskar Eichler,** Periston bei wiederholter Darreichung. Mit 6 Textabbildungen 346

— s. **Oskar Eichler** und **Helmut Hindemith.**

Bayerle, Hans, und **Rudolf Marx,** Über die Verhütung des experimentellen Muskelfrühgifttodes durch Dicumarin 328

— s. **Rudolf Marx** und **Ilsemarie Skibbe.**

Behrens, Behrend, und **Günter W. Jacobi,** Eine Methode der fortlaufenden Blutdruckregistrierung an freigelegten, nicht eröffneten Arterien. Mit 11 Textabbildungen 450

Berg, Steffen P., Histamin und weibliches Genitale 638

Buchs, S., Über den Mechanismus der Coffeinhyperglykämie. Mit 12 Textabbildungen 240

Cammerer, Andreas, Manfred Kiese und **Karl Tauschwitz,** Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol. II. Mitteilung. Der Eisenstoffwechsel bei der akuten Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Mit 6 Textabbildungen 384

Credner, Karl, Über die Beeinflussung der Diurese durch Ephedrin, Sympatol, Veritol und Pervitin. Mit 2 Textabbildungen 188

— s. **Peter Holtz.**

Deininger, Rolf s. **August Wilhelm Forst.**

Eichler, O., und **M. Hahn,** Über den Abbau der p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Ratten und seine Verwendung als Leberteste 602

— — Versuche zum Schutz gegen leberschädigende Gifte 674

— **Helmut Hindemith** und **F. Barfuß†,** Wirkung einiger organischer Fluoride auf Hefegärung und Phosphatase 83

— unter Mitwirkung von **Heinz-Wilko Klein** und **Heinz Stephan,** Kaffeewirkung bei sportlichen Übungen 251

— s. **Franz Barfuß†.**

— s. **Hermann Euler** und **Helmut Hindemith.**

Euler, Hermann, Oskar Eichler und **Helmut Hindemith,** Über die Wirkung einiger organischer Fluoride bei chronischer Darreichung 75

Finsterwalder, Gerta s. **Justus Lehmann.**

Forst, August Wilhelm, und **Rolf Deininger,** Eine neue Methode zum spezifischen biologischen Nachweis von Morphin im Harn an der Mäusepupille. Mit 6 Textabbildungen 416

Gaede, Dietrich†, und **Manfred Kiese,** Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol. V. Mitteilung. m-Dinitrobenzol und Alkohol. Mit 1 Textabbildung 569

Haas, Hans, und **Hubertus Holtzem,** Untersuchungen an offizinellem und deutschem Rhabarber 660

Seite

Haas, Hans, und **Hans Friedrich Zipf,** Über die erregende Wirkung von Barbitursäureabkömmlingen und ihre Beeinflussung durch Strychnin, Pervitin und Cardiazol. Mit 5 Textabbildungen 683

Hahn, M. s. **O. Eichler.**

Herken, Hans, und **Josef Schunk,** Untersuchungen an Eiweißkörpern mit Natriumhypochlorit. Mit 4 Textabbildungen 102

— — Über den Nachweis von Strukturveränderungen der Serumproteine mit Hypochlorit. Mit 4 Textabbildungen 302

Hermann, Sz. Vilma s. **Johann Mosonyi.**

Hindemith, Helmut s. **Oskar Eichler** und **F. Barfuß †.**

— s. **Hermann Euler** und **Oskar Eichler.**

Hölscher, Bernhard, Über den Bildungsort des uteruswirksamen Prinzips und seine Formalinstabilität. Mit 6 Textabbildungen 191

Holtz, Peter, und **Karl Credner,** Über die Beeinflussung der Adrenalindiurese durch Ergotoxin und Yohimbin. Mit 4 Textabbildungen. 180

— und **Günther Kroneberg,** Untersuchungen über die Adrenalinbildung durch Nebennierengewebe. Mit 6 Textabbildungen 150

— und **Hans-Joachim Schümann,** Karotissinusentlastung und Nebennieren. Arteronel chemischer Überträgerstoff sympathischer Nervenerregungen und Hormon des Nebennierenmarks. Mit 9 Textabbildungen 49

— und **Hans-Joachim Schümann,** Über die Potenzierung der Adrenalinwirkung durch Spartein. Mit 8 Textabbildungen 171

— und **Hans-Joachim Schümann,** Über den Arterenolgehalt des Nebennierenmarkes. Mit 8 Textabbildungen 484

Holtzem, H. s. **H. Haas.**

Huf, Ernst, und **Frieda Auffarth,** Thyreostatisch wirksame Substanzen im Tierversuch. Mit 3 Textabbildungen 394

Hufschmidt, Hans-Joachim, und **Walter Rummel,** Die Pupilleninnervation als Ausdruck der Wechselwirkung vegetativer Zentren. Mit 4 Textabbildungen 65

Jacobi, Günter W. s. **Behrend Behrens.**

Jung, Fritz, und **Herbert Remmer,** Über die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin. Mit 9 Textabbildungen 459

Kalow, Werner, Cholerese durch synthetische Mittel. I. Mitteilung. Quantitativer und qualitativer Effekt des Phenylmethylcarbinols bei der Ratte 35

— Cholerese durch synthetische Mittel. II. Mitteilung. Zur vergleichenden Physiologie und Pharmakologie der Gallensekretion 43

Kiese, Manfred, Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol. I. Mitteilung. Akute Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Mit 5 Textabbildungen 361

— Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol. III. Mitteilung. Chronische Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Mit 7 Textabbildungen 505

— Zur Pharmakologie des Tetranitromethans. Mit 2 Textabbildungen . . . 556

— s. **Andreas Cammerer** und **Karl Tauschwitz.**

— s. **Dietrich Gaede †.**

— und **Gesche Siems,** Pharmakologische Untersuchungen mit m-Dinitrobenzol. IV. Mitteilung. Leberfunktionsprüfungen durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Mit 5 Textabbildungen 528

— — Leberfunktionsprüfungen bei Vergiftungen mit Trinitrotoluol durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Mit 1 Textabbildung 546

Seite

Kroneberg, Günter s. **Peter Holtz.**

Kühn, H. A. s. **J. Pichotka.**

Lehmann, Justus, und **Gerta Finsterwalder,** Über die Denaturierung der Serumeiweißkörper durch Ultraschall und Wärme mit besonderer Berücksichtigung der Komplementfunktion 314

Lindemann, Bruno, Dissoziationstheorie der osmotischen Hämolyse. (Über die osmotische Hämolyse als Strukturproblem). Mit 16 Textabbildungen 197

— Zur Morphologie einer mechanischen Hämolyse. (Über die Hämolyse als Strukturproblem). Mit 3 Textabbildungen 220

— Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran. Mit 13 Textabbildungen 439

— Der Zerfall der alternden Erythrozytenmembran in vitro. Mit 4 Textabbildungen 611

— Alles-oder-Nichts-Gesetz oder partielle Hämolyse? Mit 6 Textabbildungen 615

Loewe, S., Benetzung als Wirkungsfaktor 357

Marx, Rudolf, Hans Bayerle und **Ilsemarie Skibbe,** Über ein Komplement und Prothrombin mit besonderer Berücksichtigung der Antithrombotica 3,3′-methylen-di-(4-oxycumarin) und Heparin 334

Mosonyi, Johann, und **Sz. Vilma Hermann,** Über die Wirkung adrenalinverwandter Verbindungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel 87

Pichotka, J., und **H. A. Kühn,** Untersuchungen zur Frage der chronischen Sauerstoffvergiftung 495

Remmer, Herbert s. **Fritz Jung.**

Riesser, Otto, Horst Weeke und **Leopold Ther,** Der gegenseitige Antagonismus von Insulin und Adrenalin-Adrenochrom bei der Glykogenbildung im isolierten Rattenzwerchfell. II. Mitteilung 12

Riesser, Otto, Ernst Laqueur. 1880—1947. 117

Rodeck, Heinz, Über die Wirkung des Äthylurethans auf Herzfrequenz und Elektrokardiogramm. Mit 5 Textabbildungen 24

Rummel, Walter s. **Hans-Joachim Hufschmidt.**

Ruppel, Werner, Organveränderungen bei E-avitaminotischen Ratten. Mit 14 Textabbildungen 584

Schümann, Hans-Joachim, Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Adrenalin, Arterenol und Epinin auf Blutdruck, Milzvolumen, Darm und Blutzucker. Mit 5 Textabbildungen 164

— Über die Wirkung von Nebennierenextrakten auf Blutdruck und Blutzucker. Mit 7 Textabbildungen 475

— s. **Peter Holtz.**

Schümmelfeder, Norbert, Das Verhalten der Cholinesterase des Blutserums im Kollaps nach Esmarchscher Blutleere und im traumatischen Schock. Mit 6 Textabbildungen 138

Schunk, Josef s. **Hans Herken.**

Siems, Gesche s. **Manfred Kiese.**

Soehring, Klaus, und **Hans Wiedow,** Über die Hemmung der Acetylcholinkontraktur des Froschrectus durch Gravitol. Mit 6 Textabbildungen 292

Skibbe, Ilsemarie s. **Rudolf Marx** und **Hans Bayerle.**

Tauschwitz, Karl s. **Andreas Cammerer** und **Manfred Kiese.**

Ther, Leopold s. **Otto Riesser** und **Horst Weeke.**

Trüb, C. L. Paul, Tierexperimentelle Untersuchungen über die Resorption und die Ausscheidung einiger Sulfonamide nach intraperitonealer Applikation. Mit 5 Textabbildungen 258

— Glomerulusfiltration und Rückresorption verschiedener Sulfonamide nach intraperitonealer Applikation im Tierversuch. Mit 1 Textabbildung 273

Seite

Vogel, Günther, Zur Frage eines renalen Angriffspunktes des Insulins . . 647

Vogt, Walther, Über die stoffliche Grundlage der Darmbewegungen und des Vagusreizes am Darm. Mit 9 Textabbildungen 1

Weeke, Horst s. **Otto Riesser** und **Leopold Ther.**

Wiedow, Hans s. **Klaus Soehring.**

Wollheim, Ernst, Intraperitoneale Transplantation von Mäusekarzinomen, eine Methode zur Erzeugung infiltrierender und metastasierender Tumoren. Mit 7 Textabbildungen 124

Zettel, Hans, Über die Kreislaufwirkung des Strychnins 283

Ziemke, Heim, Bluthistaminspiegel und örtliche Erfrierung. Mit 1 Textabbildung 288

Zipf, Hans Friedrich, Über die Wirkung von Plasma, Serum und Mellanby-Thrombin auf die Hämiglobinbildung nach Hämolyse. Mit 8 Textabbildungen 225

— s. **H. Haas.**

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Külz).

Über die stoffliche Grundlage der Darmbewegungen und des Vagusreizes am Darm.

Von

Dr. Walther Vogt.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Februar 1948.)

Im Verlauf von pharmakologischen Arbeiten am isolierten Froschrektum traten Erscheinungen auf, die unvereinbar waren mit der Annahme, daß der Stoff, der die Darmbewegung unterhält und den Vagusreiz überträgt, ausschließlich oder im wesentlichen Cholin bzw. Acetylcholin sei. Ich stellte deshalb hierüber Untersuchungen an, die zu den folgenden Ergebnissen führten.

Untersuchungen am isolierten Froschrektum.

In der Mehrzahl wurden männliche Temporarien verwandt. Versuche an weiblichen Tieren, Eskulenten und Kröten brachten die gleichen Ergebnisse. Das Rektum wurde nach Schüller[1] präpariert und in einem Gefäß mit 10 cm^3 Froschringerlösung suspendiert.

Wird ein Rektum wiederholt durch Wechseln des Ringerbads ausgewaschen, so läßt die rhythmische Tätigkeit allmählich nach und hört schließlich ganz auf. Ersetzt man dann die Ringerlösung durch eine andere, in der das Rektum zu Beginn des Versuchs bei guter Tätigkeit hing, so beginnen die Kontraktionen wieder. Auch Lösungen, in denen ein Froschmagen oder -darm gelegen hatte (in der Folge als Darmbad bezeichnet), vermögen das Rektum wieder zu erregen (Abb. 1). Die bereits von Weiland[2] am Kaninchendarm festgestellte Tatsache, daß der Darm durch eine Substanz in Tätigkeit gehalten wird, gilt daher auch für den Frosch. Der Stoff (im folgenden als „Darmstoff" bezeichnet) tritt rasch in die Ringerlösung über; schon nach einigen Minuten gewinnt sie die erregende Fähigkeit. Nach Erreichen einer gewissen Konzentration scheint keine weitere Vermehrung stattzufinden, oder es hält etwaige Zerstörung dieser die Waage. Andernfalls müßte ein in Ringerlösung suspendiertes Rektum eine kontinuierliche Erregungszunahme erfahren, was nicht beobachtet wurde.

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber den Weilandschen Untersuchungen ergibt sich nun aus dem Verhalten der Darmbäder gegenüber

Atropin. Während WEILAND die durch Darmextrakte hervorgerufene Erregung mit Atropin aufheben konnte, gelang mir das am Froschrektum nicht. Weder die normale Tätigkeit eines frischen, noch die Wiedererregung eines ausgewaschenen Präparats mit Darmbädern oder daraus bereiteten Extrakten (Herstellung siehe später) ließ sich durch Atropin hemmen oder unterbinden (Abb. 2 und 3). Vergleichsversuche mit Acetylcholin zeigten, daß die verwandten Atropindosen — im allgemeinen Verdünnungen von 1 : 1000 000—1 : 10 000 000 — die Wirkung dieser Substanz ganz unterdrücken (Abb. 3). Höhere Konzentrationen sind daher unnötig und insofern auch unvorteilhaft, als sie selbst erregend wirken können. Die Atropinfestigkeit der Rektumbewegungen zeigt somit, daß der die Tätigkeit unterhaltende Stoff nicht Acetylcholin sein kann.

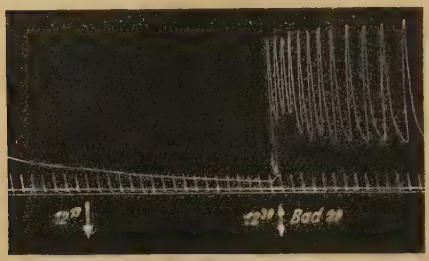


Abb. 1. Ausgewaschenes Froschrektum, Zeitmarkierung 1 Min. (die gleiche Zeitmarkierung in allen weiteren Kurven). ↓ = Austausch des Bades gegen frische Ringerlösung ↕ Bad 29 = Austausch gegen Darmbad.

Um den Darmstoff isolieren zu können, wurden einige Untersuchungen über Löslichkeit und Stabilität angestellt. Die Testung erfolgte am Froschrektum. Der Stoff ist löslich in Alkohol und Chloroform in alkalischem, neutralem oder saurem Zustand, unlöslich in absolutem Äther und Essigester. Durch 30 Min. langes Kochen und während 7stündigem Verweilen in siedendem Chloroform wird er nicht zerstört. Daraus ergab sich folgende Möglichkeit, konzentrierte Extrakte herzustellen. Eine Anzahl von Froschdärmen und -mägen wurde in Ringerlösung (50 cm³ je Magen-Darm) unter Rühren und Luftzufuhr etwa eine halbe Stunde gehalten, die Lösung noch 2—3mal erneuert und die Därme jedesmal wieder etwa eine halbe Stunde darin belassen. Nach Zusammengeben aller Bäder wurde das Wasser im Vakuum abdestilliert, die trockenen Salze mit Chloroform ausgezogen, filtriert, vom Filtrat das Chloroform verjagt und der „Rückstand"* mit dem

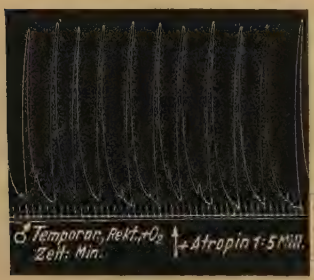


Abb. 2. Froschrektum. ↑ = Zugabe von Atropin, Endkonzentration 1: 5000000.

* Der Chloroformauszug von 3 Litern Froschdarmbad hinterläßt nach Abdampfen des Chloroforms in einem Glasschälchen von etwa 3 cm Bodendurchmesser keinen sichtbaren Rückstand, allenfalls einen hauchdünnen, wasserunlöslichen Schleier.

100. Teil des ursprünglichen Volumens Ringerlösung aufgenommen. Unter der Annahme, daß sich immer eine ungefähr konstante Konzentration des Darmstoffes in der Ringerlösung einstellt (s. oben), resultierte so ein 100facher Extrakt. Dementsprechend sind 0,1 cm³ davon im allgemeinen in der Lage, ein in 10 cm³ Ringer suspendiertes, infolge Auswaschens bewegungsloses Rektum zu normaler Tätigkeit zu bringen. An spontan arbeitenden Rektumpräparaten bewirkt die Zugabe solcher Extrakte Zunahme der Frequenz und oder Tonuserhöhung, bei starker Erregung oft Abnahme der Hubhöhe. Extraktion des Trockenrückstandes von Darmbädern mit Chloroform im Soxleth verbessert die Ausbeute nicht erkennbar. Ein 7stündiger Versuch, den

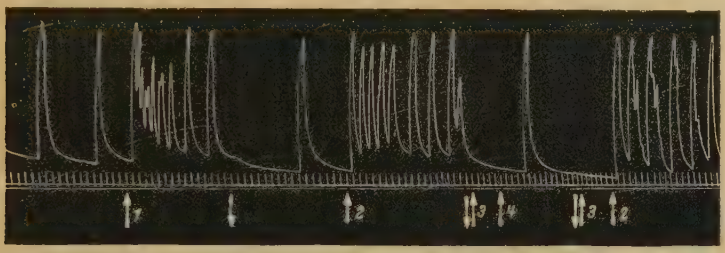


Abb. 3. Ausgewaschenes Froschrektum. ↓ = Auswaschen, ↑ 1 = Zusatz von Azetylcholin, Endkonzentration 1: 50 000 000, ↑ 2 = Zusatz von 0,2 cm³ 100fachem Froschdarmextrakt. ↑ 3 = Zusatz von Atropin, Endkonzentration 1: 5000 000. ↑ 4 = Zusatz von Azetylcholin, Endkonzentration 1: 5 000 000.

Darmstoff direkt aus dem Darmbad im Perforator mit Chloroform zu extrahieren, gelang nicht. Mit Tierkohle geschütteltes und filtriertes Darmbad hat seine Wirkung verloren; aus der Kohle läßt sich der Darmstoff wieder mit Chloroform eluieren. Die anfänglich vorgenommene Extraktion der Darmbadsalze mit absolutem Alkohol wurde zugunsten des Chloroforms verlassen, da geringe Mengen anorganischer Salze auch in absolutem Alkohol gelöst werden.

Einige Orientierungsversuche über die Empfindlichkeit des Darmstoffs gegen Säuren und Basen gaben folgendes Bild: bei p_H 13 (n/10 NaOH) zerstörte 7 Min. langes Kochen den Stoff noch nicht, aber nach 10 Min. und längerem Kochen war keine Wirkung am Rektum mehr erkennbar. Bei p_H 1 (n/10 HCl) wirkte 7 Min. langes Kochen ebenfalls nicht zerstörend. Nach Kochzeit von 10 Min. zeigte ein Extrakt noch schwache Wirkung. Nach 12 Min. war 1 cm³ Extrakt am Rektum nur von fraglicher Wirksamkeit, während 0,2 cm³ des gleichen, unbehandelten Extraktes gut wirksam waren. Quantitative Versuche über die Wirkungsabnahme nach Kochen in saurem oder alkalischen Milieu lassen sich am Rektum infolge wechselnder Ansprechbarkeit desselben

schlecht durchführen. Immerhin lassen die genannten Ergebnisse erkennen, daß der Darmstoff gegen Säuren und mehr noch gegen Basen empfindlich ist.

Wirkung des Darmstoffs auf die Froschgefäße.

Die Froschgefäßpräparate (nach TRENDELENBURG) wurden mit bikarbonatfreier Suprarenin-Ringerlösung oder mit Suprarenin-Atropin-Ringer durchströmt. Injektionen von 1 cm³, aus einem Teil 100fachem Darmextrakt und vier oder neun Teilen der jeweiligen Durchströmungslösung bestehend, verursachten deutliche Gefäßerweiterung von kurzer Dauer, die mehrmals mit gleichem Erfolg wiederholt werden konnte

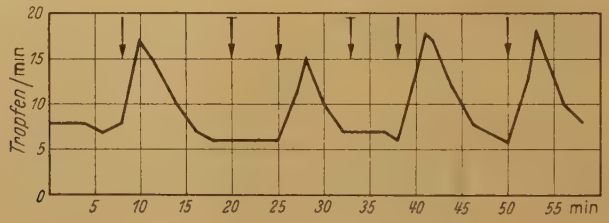


Abb. 4. Froschgefäßpräparat, Durchströmung mit bikarbonatfreier Ringerlösung unter Zusatz von Suprarenin 1: 20000000 und Atropin 1: 2000000. ↓ = Injektion von 1 cm³ aus 1 Teil 100fachem Froschdarmextrakt und 4 Teilen Durchströmungslösung. $\overline{\downarrow}$ = Injektion von 1 cm³ in gleicher Weise verdünntem Froschdarmextrakt, der 30 Min. in n/10 HCl gekocht war.

(Abb. 4). Nicht konzentriertes Darmbad war nur angedeutet wirksam. Ein mit Salzsäure (Endkonzentration n/10) eine halbe Stunde gekochter Extrakt, der am Rektum wirkungslos war, verursachte auch am Gefäßpräparat keine Reaktion.

Versuche mit Warmblüterdärmen.

Meerschweinchen- und Kaninchendünndarmstücke wurden in 30 cm³ Tyrode bei 38° suspendiert, die Meerschweinchenpräparate in einem Teil der Versuche durch Füllung des Darmlumens mit Tyrode (nach TRENDELENBURG) unter wechselnden Druck gesetzt. Die Registrierung erfolgte immer durch Längsmuskelschreibung. Der aus Froscheingeweiden gewonnene Darmstoff wirkte an diesen Organen ebenfalls erregend, auch unter Atropin (Abb. 5a und b). Umgekehrt ließ sich aus Hunde- und Meerschweinchendarmbädern Darmstoff isolieren. Einige der betreffenden Darmschlingen wurden zu diesem Zweck nach vorherigem Ausspülen in 500 cm³ Ringer mehrmals extrahiert (bei 38° und Luftzufuhr) und die erhaltenen Bäder in der beschriebenen Weise zu „100fachen" Extrakten aufgearbeitet. Die Extrakte wurden

getestet und wirksam gefunden: am Froschrektum, Meerschweinchen- und Kaninchendarm, ohne und unter Atropin (Abb. 5c und d).

Zweifellos spielt bei den Darmbewegungen der Warmblüter das Cholin eine Rolle [3], aber auch hier gelingt es nicht, mit Atropin in Dosen, die jede Cholinwirkung ausschalten, den Darm ganz zu lähmen. MAGNUS[4] konnte auf Atropin 1:20000000—1:200000 am Katzendarm gar

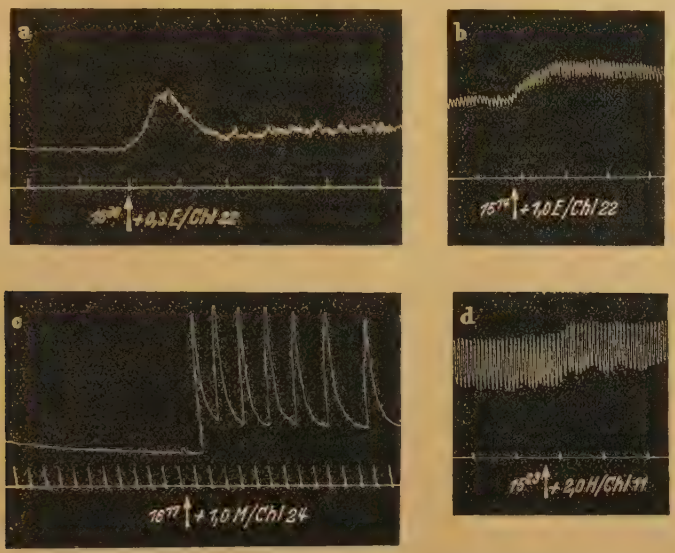


Abb. 5a—d. Alle Präparate standen unter Einwirkung von Atropin 1:10000000. a Meerschweinchendünndarm, Füllungsdruck 3,5 cm Wassersäule. Wirkung von 0,3 cm³ 100fachem Froschdarmextrakt. b Kaninchendünndarm. Wirkung von 1,0 cm³ 100fachem Froschdarmextrakt. c Ausgewaschenes Froschrektum. Wirkung von 1,0 cm³ 100fachem Meerschweinchendarmextrakt. d Kaninchendünndarm. Wirkung von 2,0 cm³ 100fachem Hundedarmextrakt.

keine Hemmung beobachten. WEILAND[2] und LE HEUX[5] zeigten, daß die durch ihre — cholinhaltigen — Extrakte hervorgerufene Erregung durch Atropin „zur Norm" zurückgeführt wurde, d. h. die Grundlage der Darmbewegungen blieb bestehen und nur die Cholinkomponente wurde ausgeschaltet. Auch nach Auswaschen des Cholins war noch Peristaltik vorhanden; Atropin wirkte nun nicht mehr hemmend[5].

Aus den genannten Ergebnissen läßt sich daher der Schluß ziehen, daß die stoffliche Grundlage der Darmbewegungen auch beim Warmblüter weniger im Cholin als im atropinfesten Darmstoff zu sehen ist.

Abgrenzung des Darmstoffs gegenüber anderen, ähnlich wirkenden Substanzen.

1. Acetylcholin.

Daß es sich nicht um Acetylcholin handeln kann, wurde bereits erörtert. Überdies ist auch die Wirkung beider Stoffe am Rektum etwas verschieden. Acetylcholin verursacht fast augenblicklich eine maximale Kontraktion, die Erregung nimmt danach bald ab, während der Darmstoff meistens erst nach einer Latenz von wenigen Sekunden bis Minuten wirkt, wobei die Erregung lange anhält und häufig an Stärke noch zunimmt.

2. Histamin.

Die Möglichkeit, daß die beschriebenen Wirkungen des Darmstoffs durch Histamin bedingt sind, läßt sich ebenfalls ausschalten. Froschdarmextrakte, eine halbe Stunde lang in n/10 HCl gekocht, erweisen sich u. a. auch am Meerschweinchendarm, dem für Histamin empfindlichsten Organ, als wirkungslos, während Histamin selbst durch 30stündiges Kochen in 20% Salzsäure nicht zerstört wird [6]. Die Empfindlichkeit von Froschrektum und Meerschweinchendarm gegenüber dem Darmstoff ist ungefähr gleich; gegenüber Histamin ist der Meerschweinchendarm mehr als 1000mal empfindlicher (Histamin 1 : 100000 ist am Froschrektum noch wirkungslos).

3. Substanz „P".

Auf der Suche in der Literatur nach weiteren darmerregenden und gefäßerweiternden Stoffen stieß ich auf die Substanz „P" von v. Euler und Gaddum[7]. Herkunft der Extrakte, pharmakologische Wirkungen, Löslichkeitsverhältnisse und die Empfindlichkeit gegenüber Säuren und Basen ließen vermuten, daß Substanz „P" und Darmstoff identisch waren. Ich versuchte daher auch die von den genannten Autoren erwähnte Methode, den Darmstoff an ausfallende Benzoesäure zu adsorbieren und durch Herauslösen des Adsorbens mit Äther zu isolieren. Der Versuch gelang. Die Eulersche Extraktionsweise aus Organ*brei* wurde nicht nachgearbeitet. Möglicherweise lassen sich damit höhere Ausbeuten erzielen, aber sicher ist auch der Prozentsatz der Verunreinigungen höher, und die von mir angewandte Extraktion aus dem lebenden Darm zeigt, daß es sich bei dem Darmstoff wirklich um einen biogenen Wirkstoff handelt und nicht um ein etwa erst postmortal entstandenes Zerfallsprodukt, was für die später erörterte Bedeutung des Stoffes von Wichtigkeit ist.

Über die physiologische Bedeutung des Darmstoffs. Vagusreizversuche.

Loewi zeigte erstmals am Froschherzen, daß durch Vagusreizung eine Substanz frei wurde, die genau wie die Nervenerregung selbst und

wie Acetylcholin wirkte [8]. Diese Ergebnisse wurden dann dahingehend erweitert, daß man im Acetylcholin allgemein den Überträgerstoff des Parasympathikus sah. Am Magen-Darmtrakt ist aber meines Wissens bisher weder für die Richtigkeit dieser These noch überhaupt für die humorale Übertragbarkeit des Vagusreizes ein experimenteller Beweis geliefert worden. Und gerade hier besteht ein wichtiger Unterschied in der Wirkung von Vagus und Acetylcholin. Dixon machte die Beobachtung, daß der Froschmagen in situ nach Atropinapplikation unverändert auf Vagusreiz anspricht [9]. Eigene Versuche hatten dasselbe Ergebnis. Bayliss und Starling führten positive Vagusreizungen am Hundedarm unter Einwirkung kleiner und großer Atropindosen durch[10]. Ihre Ergebnisse wurden von Cushny bestätigt [11].

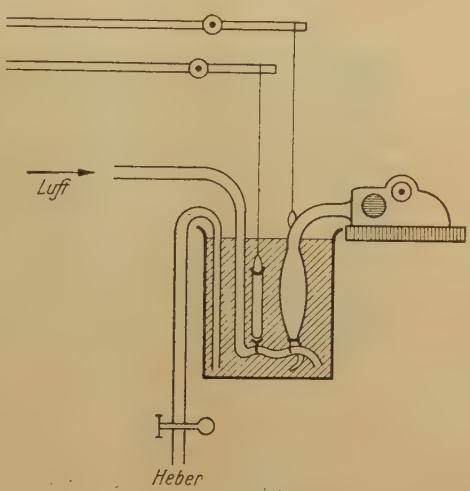


Abb. 6.

Die Versuche von Bayliss und Starling wurden von Fröhlich und Loewi angezweifelt [12]. Die Reizerfolge sollten infolge Übererregung des Darmes, die möglicherweise durch die hohen Atropindosen (30 mg) selbst bewirkt sein könnte, zustande gekommen sein; der übererregte Darm sollte der Atropinwirkung unzugänglich sein. Nun haben aber Bayliss und Starling auch mit geringeren Mengen Atropin (4 mg) dieselben Ergebnisse gefunden. Außerdem wirkt Atropin gerade an dem durch Cholin und pharmakologisch verwandte Substanzen übererregten Darm besonders schlagend, und es ist nicht einzusehen, warum die Zunahme an Aktivität nach Vagusreiz eine Atropinwirkung sein soll und nicht Ausdruck der Nervenerregung. An Blase und Rektum fanden überdies Fröhlich und Loewi selbst, daß Atropin den Erfolg parasympathischer Reizung nicht aufhob.

Während also der Erfolg der Darmvagusreizung durch Atropin nicht aufgehoben wird, steht auf der anderen Seite fest, daß Acetylcholin (sowie die Muskarin- und Cholingruppe) zwar an sich den Darm erregt, aber nach Atropin keine Wirkung mehr hat. Wenn also die Erregung der Darmvagusfasern überhaupt durch einen Überträgerstoff wirksam wird, kann Acetylcholin dafür nicht in Betracht kommen, sondern nur eine atropinfeste, darmerregende Substanz.

Um die Frage der humoralen Übertragbarkeit des Darmvagusreizes zu klären, wählte ich folgende Versuchsanordnung. Ein Froschmagen, der mit beiden Vagusnerven noch in Verbindung stand, und

ist, sondern die gleichen Eigenschaften wie der Darmstoff hat. Will man nicht annehmen, daß trotzdem ein Unterschied zwischen der Überträgersubstanz und dem Darmstoff besteht — wofür kein Grund besteht — so ist damit nachgewiesen, daß auf Nervenerregung eine vermehrte Ausschüttung oder Bildung von Darmstoff erfolgt. Mithin steht dieser in enger Beziehung zum autonomen Nervensystem und hat den Charakter eines Hormons für die Darmbewegung. Wahrscheinlich ist aber der Darmstoff kein für den Verdauungstrakt spezifischer Körper, da die Substanz „P", die nach meiner Ansicht mit dem Darmstoff identisch ist, nach den Untersuchungen v. EULERs außer im Darm auch in anderen Organen und im Blut [7], neuerdings auch von WEISSBECKER [13] im Blut gefunden wurde. WEISSBECKER vermutete bereits (für die Substanz „P") einen allgemeineren Wirkungskreis, lehnte aber einen Zusammenhang mit dem Nervensystem ab. Das in vielen Organen nachgewiesene Vorkommen zusammen mit der neuen Tatsache, daß sich auf Nervenreizung eine Mehrausschüttung erkennen läßt, spricht aber meines Erachtens dafür, daß im Darmstoff eine Überträgersubstanz für die Erregung bestimmter Nervenfasern, die möglicherweise als ein eigenes System gegenüber dem atropinempfindlichen Vagus und dem Sympathikus abzugrenzen sind, vorliegt. Weitere Untersuchungen zu diesem Problem werden in Angriff genommen.

Zusammenfassung.

1. Kalt- und Warmblüterdärme machen einen Stoff frei, der den Darm erregt bzw. seine Bewegungen unterhält, atropinfest ist und die Froschgefäße erweitert.

2. Auf Vagusreiz wird der Darmstoff vom Froschmagen vermehrt abgesondert. Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß es sich um die Überträgersubstanz bestimmter, abzugrenzender Nervenfasern handelt.

3. Es handelt sich bei dem Darmstoff nicht um Acetylcholin oder Histamin. Wahrscheinlich ist er identisch mit der Substanz „P".

Nachtrag bei der Korrektur.

Inzwischen bin ich auf eine Arbeit [14] aufmerksam geworden, in der DALE und FELDBERG am durchströmten Hundemagen auf Vagusreizung eine Vermehrung von Azetylcholin beobachteten. Andere Stoffe als Azetylcholin wurden nicht gefunden. Zu diesem Ergebnis, das im Widerspruch zu meinen Versuchen steht, läßt sich folgendes sagen. Die Möglichkeit, daß das Azetylcholin auf die Erregung sekretorischer Vagusfasern hin frei wurde, konnten die genannten Autoren

nicht ausschließen. Eine Mehrausschüttung eines atropinfesten, darmerregenden Stoffes, die sich eventuell in einer atropinfesten Blutdrucksenkung an den zur Testung verwandten Katzen hätte äußern müssen, konnte dadurch der Beobachtung entgehen, daß der betreffende Stoff in der aus dem Hundemagen abfließenden Durchströmungsflüssigkeit in zu schwacher Konzentration enthalten war. Nach Untersuchungen von Gaddum und Schild [15] sind die Katzengefäße gegen Substanz „P" relativ unempfindlich.

Um den Unterschied der Vagus- und der Azetylcholinwirkung nach Atropin erklären zu können, stellten Dale und Gaddum eine Hypothese auf, nach der Atropin als eine Schranke wirken soll, die den Zutritt des Azetylcholins zum Ort der Wirkung verhindert [16]. Im Falle des Magendarms soll das Azetylcholin direkt am Wirkungsort gebildet werden, so daß Atropin hier den Erfolg der Vagusreizung nicht unterbinden kann. Wenn das richtig ist, dürfte aber nach meiner Ansicht Atropin am Darm gar keinen Hemmungseffekt zeigen, denn das laufend gebildete, die normalen Bewegungen mit unterhaltende Cholin entsteht doch sicher an derselben Stelle, also auch am Wirkungsort. Außerdem dürfte Atropin dann nicht eine bereits eingetretene (Azetyl-) Cholinwirkung sofort aufheben; in diesem Fall ist ja das erregende Agens ebenfalls am Wirkungsort.

Literatur.

[1] Schüller: Arch. exper. Path. (D.) **90**, 196. — [2] Weiland: Pflügers Arch. **147**, 171. — [3] le Heux: Pflügers Arch. **173**, 8. — [4] Magnus: Pflügers Arch. **123**, 95. — [5] le Heux: Pflügers Arch. **179**, 177. — [6] Feldberg u. Schilf: Histamin **1930**, 18. — [7] Euler v. and Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **72**, 74. — [8] Loewi: Pflügers Arch. **214**, 678. — [9] Dixon: J. Physiol. (Brit.) **28**, 57. — [10] Bayliss and Starling: J. Physiol. (Brit.) **24**, 99. — [11] Cushny: J. Physiol. (Brit.) **41**, 233. — [12] Fröhlich u. Loewi: Arch. exper. Path. (D.) **59**, 34. — [13] Weissbecker: Arch. exper. Path. (D.) **204**. 674. — [14] Dale u. Feldberg: J. Physiol. (Brit.) **81**, 320. — [15] Gaddum u. Schild: J. Physiol. (Brit.) **83**, 1. — [16] Dale u. Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **70**, 109.

Aus dem Chemisch-physiologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.

Der gegenseitige Antagonismus von Insulin und Adrenalin-Adrenochrom bei der Glykogenbildung im isolierten Rattenzwerchfell.

II. Mitteilung.

Von

Otto Riesser, Horst Weeke und Leopold Ther.

(Eingegangen am 26. Februar 1948.)

In Versuchen am isolierten Zwerchfell junger Ratten hat der eine von uns[1], mit der Methode von Gemmill[2] arbeitend und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieses Forschers und seiner Mitarbeiter[3], die Synthese von Glykogen aus Glukose in vitro und ihre erhebliche Verstärkung durch Zusatz von *Insulin* nachweisen können. An diesen Befunden ist nicht nur die Tatsache bemerkenswert, daß man den direkten Angriff des Insulins am Muskel besonders eindeutig darstellen kann; fast noch wichtiger ist das Präparat als solches, das infolge seiner Dünne (es dürfen nur junge Tiere zwischen 100 und 140 g Gewicht benutzt werden) optimal mit Sauerstoff versorgbar ist und Dank der völligen Intaktheit seiner Zellstruktur sich durch die Fähigkeit zu *Synthesen* als im wahren Sinne überlebend erweist. Ein derartiges Versuchsobjekt ist für Untersuchungen mannigfachster Art allein brauchbar und sehr viel günstiger als der Brei oder gar das Extrakt von Muskeln, Präparate, die wegen der Zerstörung der feineren Zellstruktur ausschließlich Abbauvorgänge aufweisen und daher nicht als überlebend, sondern als absterbend zu gelten haben. Es läßt sich leicht zeigen (Riesser a. a. o.), daß die synthesebegünstigende Wirkung zugefügten Insulins an die Intaktheit der Struktur des Präparats und an optimale Sauerstoffzufuhr gebunden ist. Der Angriffspunkt des Hormons muß also an einem Vorgang oder an den Bedingungen eines Vorgangs zu suchen sein, der seinerseits an diese Faktoren gebunden ist. Da wir durch Coris[4] Arbeiten wissen, daß von den beiden Stufen des Glykogenaufbaus aus Glukose, nämlich der Phosphorylierung der Glukose zu Hexosemonophosphorsäure und der Kondensation dieses Esters zu Glykogen nur der erste Vorgang struktur- und oxydationgebunden ist, so muß der Angriffspunkt des Insulins hier, an der Esterbildung, liegen und seine Wirkung muß in einer Begünstigung des Veresterungsprozesses bzw. der ihn ermöglichenden

Zustandsbedingungen der Zelle bestehen. Vielleicht ist die Sauerstoffabhängigkeit insofern die primäre Bedingung, als sie die Intaktheit der Zellstruktur garantiert (vgl. hierzu RIESER[5]) und weil nur im strukturintakten Zellmilieu die abbauenden Fermente, insbesondere die Phosphatasen, unwirksam bleiben, die aufbauenden dagegen entsprechend begünstigt und von jeder Gegenwirkung befreit sind. Daß es CORI[6] gelang, aus Glukose und Phosphat bei Gegenwart von Adenosintriphosphat und Hexokinase den Hexose-1-phosphorsäure-Ester und über ihn Glykogen aufzubauen, ist durchaus verständlich, wenn man bedenkt, daß auch in diesem Ansatz die Phosphatasen ausgeschaltet sind, indem sie von vornherein fehlen.

Die Tatsache, daß man am isolierten Rattenzwerchfell die periphere, Glykogensynthese aus Glukose fördernde Wirkung des Insulins in quantitativen Analysen messend bestimmen kann, gewinnt an Interesse durch den von RIESSER[1] erbrachten Nachweis, daß bei gleichzeitigem Zusatz von *Adrenalin* die Wirkung des Insulins weitgehend gehemmt oder ganz unterdrückt wird. Die auch ohne Insulin sich im Zwerchfell abspielende Glykogensynthese aus Glukose wird durch Adrenalin aufgehoben bzw. stark abgeschwächt und im Ansatz ohne Glukose wird präformiertes Glykogen unter Adrenalin teilweise abgebaut. Keine sicheren Ergebnisse wurden bei Zusatz von Cortin oder Desoxycorticosteron erhalten, weder im Versuch ohne noch im Versuch mit Insulin ließ sich eine Wirkung feststellen. Besonders bemerkenswert verliefen Versuche von RIESSER[1], die den Nachweis erbrachten, daß nicht nur die Insulinwirkung durch Adrenalin, sondern auch die Adrenalinwirkung durch Insulin gehemmt oder aufgehoben wird. Wir werden auf diese Versuche an Hand neuer Experimente weiter unten zurückkommen. Unklar und wenig befriedigend waren die Versuche von RIESSER[1], eine Einwirkung von Thyroxin sowie von den Vitaminen C, B_1 und von Laktoflavin auf die Glykogenbildung im Zwerchfellpräparat nachzuweisen. Die Versuche litten unter den oft relativ großen Differenzen der Glykogenwerte zweier gleich behandelter Zwerchfellhälften ($\pm$ 15% im Mittel). Die schwierigen Bedingungen, unter denen jene Versuche während des letzten Jahres der Okkupation Hollands durchgeführt werden mußten, mögen ihren Anteil daran haben, daß, abgesehen von den allerdings völlig eindeutigen Ergebnissen der Insulin- und Adrenalinversuche die übrigen zahlreichen Versuchsreihen kein klares Ergebnis zeitigten. Im Hinblick hierauf schien eine Wiederholung und Ergänzung jener Versuche dringend erwünscht. Dies ist in der vorliegenden Arbeit geschehen. Insbesondere sollte eine schon in der ersten Arbeit aufgeworfene Frage nunmehr experimentell entschieden werden. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß das Adrenalin seine den Glykogenabbau fördernde und die Synthese hemmende Wirkung in

einer Versuchsanordnung ausübte, bei der trotz des herrschenden p_H von 5,2 seine partielle Oxydation möglich war. Riesser[1] konnte zeigen, daß eine Adrenalin-Ringerlösung vom p_H 5,2 und mit 0,5% Glukose, die zunächst 30 Min. bei 37° mit Sauerstoff durchströmt war, bei nachträglichem Zusatz des Muskels und von Insulin die Wirkung des Hormons völlig aufhob. Es wäre immerhin möglich, daß ein bei der Oxydation des Adrenalins gebildeter Stoff, vielleicht das Adrenochrom, der eigentliche Antagonist des Insulins ist. Unter Verwendung reinen Adrenochroms, das wir der Freundlichkeit der Höchster Farbwerke verdanken, mußte diese Frage zu entscheiden sein.

Methodik.

Die Präparierung des Zwerchfells von 120—140 g schweren jungen Ratten in Form zweier mit je einem halben Rippenring in Zusammenhang bleibender Hälften erfolgte gemäß den von Riesser[1] gemachten Angaben; auf die vorherige Beseitigung der Nebennieren, die sonst leicht einmal dem Präparat anhaften, wurde stets geachtet. Je eine Zwerchfellhälfte, Gewicht um 0,1 g, kam in 10 cm³ einer karbonatfreien Ringerlösung mit einem Zusatz von 0,25 oder 0,5% Glukose und 0,05% NaH_2PO_4, p_H 5,2. Die Gläser standen in einem konstant bei 37° C gehaltenen Wasserbad und wurden mittels fein ausgezogener Röhrchen während der $2^1/_2$stündigen Versuchsdauer mit O_2 durchperlt. Sie wurden dann herausgenommen, kurz mit Ringerlösung abgespült, vom Rippenring abpräpariert und nach oberflächlichem Abtrocknen auf Filterpapier schnell an der Torsionswage gewogen, endlich in 2 cm³ heiße 30%ige Kalilauge geworfen, die in Zentrifugenröhrchen von 10 cm³ Inhalt im kochenden Wasserbad standen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Good, Kramer und Somogyi[7] mit der Maßgabe, daß statt des 3stündigen Hydrolysierens des Glykogens mit 2,2% HCl eine nur 20 Min. beanspruchende Hydrolyse mit 5n-H_2SO_4 angewandt wurde, wie sie Sahyun[8] empfohlen hat. In 5 cm³ des auf 50 cm³ gebrachten, mit NaOH neutralisierten Hydrolysats wurde schließlich die Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jenssen ausgeführt.

Ergebnisse.

1. Die Fehlergrenze der Methodik, d. h. die Schwankungsbreite der Differenz zwischen zwei gleich behandelten Hälften eines Zwerchfells erweist sich unter den jetzigen günstigen Arbeitsbedingungen wesentlich kleiner als in den früheren Versuchen. Sie beträgt nur $\pm$ 4% statt früher 15% (Tabelle 1).

2. Bei Gegenwart von Glukose 0,25% wird, in Bestätigung früherer Versuche, in zwei Experimenten eine Zunahme von 27,5% und 43% Glykogen gegenüber dem in glukosefreier Lösung gefundenen Glykogengehalt der Kontrollhälfte festgestellt; die entsprechenden Versuche der ersten Arbeit ergaben ein Durchschnittsplus von 38%.

3. In den mit Ringer-Glukose angesetzten Zwerchfellen ergeben insgesamt 29 Versuche einen Mittelwert von 715 mg-% gegenüber dem aus 129 Einzelversuchen der ersten Arbeit berechneten Wert von

Tabelle 1. *Zwei je gleich behandelte Zwerchfellhälften. Glykogenwerte hier und später in mg-%.*

Versuchs-Nr.	Versuchsbedingungen	a	b	Abweichung
1	Sofort	734	777	+43
2	Sofort	583	615	+32
76	Glukose $2^1/_2$ Std.	890	850	−40
52	desgl.	1370	1400	+30
36	Glukose/Insulin $2^1/_2$ Std.	1530	1560	+30
33	desgl.	700	680	−20
53	,,	1570	1570	± 0
74	,,	500	409	−91
79	,,	781	760	−21
82	,,	298	267	−31
83	,,	642	693	+51
Mittel		872	879	35
			+ 4,0%	

596 mg-%. Bei Zusatz von 2—3 Einheiten *Insulin* hatte RIESSER[1] einen Mittelwert von 1213 mg-% Glykogen aus 99 Versuchen errechnet, was ein Mehr von 104% gegenüber den in insulinfreier Glukose-Ringer gehaltenen Kontrollen bedeutet. In den diesem Problem allein gewidmeten Sonderversuchsreihen jener Arbeit lauten bei einem Gehalt von 0,25% Glukose die Werte 495 und 730 mg mit einem Plus von 47,5% (9 Versuche) und bei 0,5% Glukose 602 und 999 mg-%, d. h. mit einem Plus von 66%. Unsere sieben neuen Versuche mit 2 und 3 Einheiten Insulin zeigen (Tabelle 2) einen Mittelwert von 1136 mg-% Glykogen gegenüber 740 mg-% der Kontrollen, was einer Zunahme von 53% entspricht. Sehr deutlich zeigt die Tabelle, daß, wie schon

Tabelle 2. *Versuche mit Glukose allein sowie mit Glukose plus Insulin.*

Versuchs-Nr.	Ringer	Ringer Glukose	Ringer Glukose Insulin	Insulin Einheit	Differenz	Zunahme in %
3	684	887		—	+223	+27,5
4	780	1116		—	+336	+43
5		707	783	1	76	+11
7		763	783	1	20	+2,6
9		807	870	1	63	+7,8
6		1097	1346	2	249	+23
8		659	1010	2	351	+53
10		443	965	2	522	+118
11		764	1056	3	292	+38
12		772	902	3	130	+17
13		651	1349	3	698	+107
14		795	1324	3	529	+66,5
Mittel von Versuch 6—14		740	1136		396	+53

in der ersten Arbeit gefunden wurde, mit einer Einheit Insulin die Wirkung kaum noch zu erhalten ist.

Demgegenüber stehen allerdings Angaben von Verzár und Wenner[9], die in einer neueren Arbeit mit sehr viel geringeren Insulinmengen eine deutliche Wirkung finden.

4. Die antagonistische Wirkung des *Adrenalins* gegenüber dem Insulin ließ sich voll bestätigen (Tabelle 3). Dosen von 25—100 γ vermochten die Insulinwirkung um im Mittel 38% zu vermindern; in den älteren Versuchen, die wegen der grundsätzlichen Bedeutung dieser Ergebnisse in Tabelle 3 nochmals angeführt sind, betrug die mittlere Abnahme 40%.

5. Die Wirkung des Adrenalins auf die Glykogenbildung *ohne* Insulin ist in den Versuchen der Tabelle 4 dargestellt. Auch hier sind zum Vergleich die älteren Werte angeführt. Die sechs neuen Versuche zeigen im Adrenalinversuch eine Verringerung der Synthese von 31% gegenüber 35% in den älteren Versuchen. Berücksichtigt man, daß die Glykogensynthese aus Glukose gemäß dem oben angeführten im Mittelwert 35—38% beträgt, so muß man annehmen, daß Adrenalin diesen Prozeß nahezu völlig unterdrückt.

Tabelle 3. *Vergleich von Insulin allein mit Insulin plus Adrenalin.*

Versuchs-Nr.	Glukose-Insulin	Glukose Insulin Adrenalin	Differenz	Glukose Konzentration in %	Insulin Einheit	Adrenalin γ
80 Ri *	2070	1600	−470	0,5	2	100
81 Ri	1090	560	−530	0,5	2	100
82 Ri	1000	540	−460	0,5	2	50
84 Ri	980	420	−560	0,5	2	50
86 Ri	900	460	−440	0,5	2	50
87 Ri	1020	630	−390	0,5	2	50
125 Ri	840	500	−340	0,5	2	50
Mittel	1130	673	−457			Mittlere Differenz −40%
22	1520	1010	−510	0,25	3	25
32	830	510	−320	0,25	3	25
21	1440	690	−750	0,25	3	50
31	980	440	−540	0,25	3	50
39	1860	1050	−810	0,25	3	50
15	1060	930	−130	0,25	3	100
16	1460	750	−710	0,25	3	100
17	1100	800	−300	0,25	3	100
18	1055	830	−225	0,25	3	100
Mittel	1257	779	−478			Mittlere Differenz −38%

* Die mit Ri bezeichneten Versuche entstammen der I. Mitteilung, Tabelle 17.

Tabelle 4. *Vergleich: Glukose allein mit Glukose plus Adrenalin.*

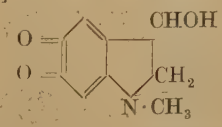
Versuchs-Nr.	Glukose	Glukose plus Adrenalin	Differenz	Glukose %	Adrenalin γ
86 Ri*	550	280	−270	0,5	50
87 Ri	680	450	−230	0,5	50
88 Ri	710	460	−250	0,5	50
85 Ri	450	370	− 80	0,5	50
Mittel	597	390	−207 (−35%)		
77	852	692	−160	0,5	50
19	880	790	− 90	0,25	100
20	800	720	− 80	0,25	100
78	880	424	−456	0,5	100
84	654	365	−289	0,5	100
85	551	188	−363	0,5	100
Mittel	769	529	−240 (−31%)		
76	890	850	− 40	0,5	25

* Die mit Ri bezeichneten Versuche entstammen der I. Mitteilung.

6. Wie wir schon einleitend ausführten, hat RIESSER[1] gezeigt, daß auch die Adrenalinwirkung durch Insulin aufgehoben wird. Dies ließ sich nur so nachweisen, daß man Adrenalin und Insulin im Ansatz *ohne* Glukose einwirken ließ, so daß eine Glykogensynthese ausgeschlossen war. Während nun Adrenalin in glukosefreier Lösung eine Verminderung des *präformierten Glykogens* bewirkt, die in den älteren Versuchen 27%, in unseren neuen 38% beträgt (Tabelle 5), bleibt diese Wirkung aus, wenn man auch noch Insulin zufügt. Dies zeigt sich darin, daß in den Proben mit Adrenalin plus Insulin der Mittelwert des Glykogens um 48%, in den neuen Versuchen sogar um 106% größer ist als in den nur mit Adrenalin angesetzten Proben, in denen ein Teil des Glykogens abgebaut wird.

Für die Deutung des Wesens des Adrenalin-Insulinantagonismus sind diese Versuche, wie wir sehen werden, von besonderem Belang.

7. Gemäß unserer in der Einleitung dargelegten Aufgabenstellung unternahmen wir eine Reihe von Versuchen, in denen an Stelle von Adrenalin sein Oxydationsprodukt, das *Adrenochrom*



verwendet wurde. Wie Tabelle 6 ausweist, zeigt es sich, daß auch Adrenochrom, ebenso wie Adrenalin, die Insulinwirkung hemmt und zwar in Dosen von 20—100 γ. Die Hemmung beträgt im Mittelwert 30% (9 Versuche); sie ist ebenfalls regelmäßig reproduzierbar.

in der ersten Arbeit gefunden wurde, mit einer Einheit Insulin die Wirkung kaum noch zu erhalten ist.

Demgegenüber stehen allerdings Angaben von Verzár und Wenner[9], die in einer neueren Arbeit mit sehr viel geringeren Insulinmengen eine deutliche Wirkung finden.

4. Die antagonistische Wirkung des *Adrenalins* gegenüber dem Insulin ließ sich voll bestätigen (Tabelle 3). Dosen von 25—100 γ vermochten die Insulinwirkung um im Mittel 38% zu vermindern: in den älteren Versuchen, die wegen der grundsätzlichen Bedeutung dieser Ergebnisse in Tabelle 3 nochmals angeführt sind, betrug die mittlere Abnahme 40%.

5. Die Wirkung des Adrenalins auf die Glykogenbildung *ohne* Insulin ist in den Versuchen der Tabelle 4 dargestellt. Auch hier sind zum Vergleich die älteren Werte angeführt. Die sechs neuen Versuche zeigen im Adrenalinversuch eine Verringerung der Synthese von 31% gegenüber 35% in den älteren Versuchen. Berücksichtigt man, daß die Glykogensynthese aus Glukose gemäß dem oben angeführten im Mittelwert 35—38% beträgt, so muß man annehmen, daß Adrenalin diesen Prozeß nahezu völlig unterdrückt.

Tabelle 3. *Vergleich von Insulin allein mit Insulin plus Adrenalin.*

Versuchs-Nr.	Glukose-Insulin	Glukose Insulin Adrenalin	Differenz	Glukose Konzentration in %	Insulin Einheit	Adrenalin γ
80 Ri *	2070	1600	−470	0,5	2	100
81 Ri	1090	560	−530	0,5	2	100
82 Ri	1000	540	−460	0,5	2	50
84 Ri	980	420	−560	0,5	2	50
86 Ri	900	460	−440	0,5	2	50
87 Ri	1020	630	−390	0,5	2	50
125 Ri	840	500	−340	0,5	2	50
Mittel	1130	673	−457			Mittlere Differenz −40%
22	1520	1010	−510	0,25	3	25
32	830	510	−320	0,25	3	25
21	1440	690	−750	0,25	3	50
31	980	440	−540	0,25	3	50
39	1860	1050	−810	0,25	3	50
15	1060	930	−130	0,25	3	100
16	1460	750	−710	0,25	3	100
17	1100	800	−300	0,25	3	100
18	1055	830	−225	0,25	3	100
Mittel	1257	779	−478			Mittlere Differenz −38%

* Die mit Ri bezeichneten Versuche entstammen der I. Mitteilung, Tabelle 17.

Tabelle 4. *Vergleich: Glukose allein mit Glukose plus Adrenalin.*

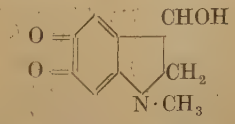
Versuchs-Nr.	Glukose	Glukose plus Adrenalin	Differenz	Glukose %	Adrenalin γ
86 Ri*	550	280	−270	0,5	50
87 Ri	680	450	−230	0,5	50
88 Ri	710	460	−250	0,5	50
85 Ri	450	370	− 80	0,5	50
Mittel	597	390	−207 (−35%)		
77	852	692	-160	0,5	50
19	880	790	− 90	0,25	100
20	800	720	− 80	0,25	100
78	880	424	−456	0,5	100
84	654	365	−289	0,5	100
85	551	188	−363	0,5	100
Mittel	769	529	−240 (−31%)		
76	890	850	− 40	0,5	25

* Die mit Ri bezeichneten Versuche entstammen der I. Mitteilung.

6. Wie wir schon einleitend ausführten, hat RIESSER[1] gezeigt, daß auch die Adrenalinwirkung durch Insulin aufgehoben wird. Dies ließ sich nur so nachweisen, daß man Adrenalin und Insulin im Ansatz *ohne* Glukose einwirken ließ, so daß eine Glykogensynthese ausgeschlossen war. Während nun Adrenalin in glukosefreier Lösung eine Verminderung des *präformierten Glykogens* bewirkt, die in den älteren Versuchen 27%, in unseren neuen 38% beträgt (Tabelle 5), bleibt diese Wirkung aus, wenn man auch noch Insulin zufügt. Dies zeigt sich darin, daß in den Proben mit Adrenalin plus Insulin der Mittelwert des Glykogens um 48%, in den neuen Versuchen sogar um 106% größer ist als in den nur mit Adrenalin angesetzten Proben, in denen ein Teil des Glykogens abgebaut wird.

Für die Deutung des Wesens des Adrenalin-Insulinantagonismus sind diese Versuche, wie wir sehen werden, von besonderem Belang.

7. Gemäß unserer in der Einleitung dargelegten Aufgabenstellung unternahmen wir eine Reihe von Versuchen, in denen an Stelle von Adrenalin sein Oxydationsprodukt, das *Adrenochrom*



verwendet wurde. Wie Tabelle 6 ausweist, zeigt es sich, daß auch Adrenochrom, ebenso wie Adrenalin, die Insulinwirkung hemmt und zwar in Dosen von 20—100 γ. Die Hemmung beträgt im Mittelwert 30% (9 Versuche); sie ist ebenfalls regelmäßig reproduzierbar.

Tabelle 5. *Alle Versuche ohne Glukosezusatz. I. Gruppe: Vergleich Ringer mit Ringer-Adrenalin; II. Gruppe: Vergleich Ringer-Adrenalin mit Ringer-Adrenalin-Insulin.*

	Versuchs-Nr.	Ringer	Ringer Adrenalin	Differenz	Ringer Adrenalin	Ringer Adrenalin Insulin	Differenz	Adrenalin γ
Gruppe I	121 Ri*	940	700	−240				50
	122 Ri	650	460	−190				50
	123 Ri	950	670	−280				100
	124 Ri	390	320	− 70				50
	Mittel	732	538	194 27%				
	94	500	317	183				100
	95	300	237	− 63				100
	96	423	325	− 98				100
	97	705	315	−390				100
	Mittel	482	298	184 38%				
Gruppe II	121 Ri				360	640	+280	50
	122 Ri				410	720	+310	50
	123 Ri				450	600	+150	100
	124 Ri				340	350	+ 10	50
	Mittel				390	578	+188 +48%	
	100				109	409	+300	100
	101				180	236	+ 56	100
	102				145	275	+130	100
	103				265	340	+ 75	100
	104				446	1093	+647	100
	Mittel				229	471	+242 +106%	

* Die mit Ri bezeichneten Versuche entstammen der I. Mitteilung.

Tabelle 6. *Vergleich Insulin mit Insulin plus Adrenochrom.*

Versuchs-Nr.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Adrenochrom	Differenz	Glukose %	Adrenochrom γ
23	1400	1000	−400	0,25	100
24	1180	730	−450	0,25	100
25	1210	1060	−150	0,25	100
26	1400	710	−690	0,25	100
27	1590	1090	−500	0,25	25
28	1280	1060	−220	0,25	50
29	1300	1180	−120	0,25	100
30	700	550	−150	0,25	200
50	1000	320	−620		20
Mittel	1228	855	−373 −30%		

Angesichts dieses Befundes muß man schließen, daß in den Adrenalin-Insulinversuchen, soweit die Bedingungen für eine Adrenalinoxydation gegeben sind, die antagonistische Wirkung gegenüber dem Insulin auf der Bildung von Adrenochrom beruhen könnte, das seinerseits den Insulineffekt hemmt. Berücksichtigt man, daß Insulin, wie wir soeben (Punkt 6) zeigten, auch die Wirkung des Adrenalins aufhebt, so könnte man sich vorstellen, daß der gegenseitige Antagonismus auf Bildung einer chemischen Verbindung von Adrenalin oder Adrenochrom und Insulin beruht, die selbst biologisch unwirksam ist. Die Vorstellung, daß das Insulin durch Adrenochrom als Sauerstoffüberträger oxydiert wird und daß diese Oxydation dem Antagonismus des Adrenalins gegenüber dem Insulin zugrunde liegt, erscheint unvereinbar mit der Tatsache, daß auch umgekehrt die Adrenalinwirkung durch das Insulin aufgehoben wird.

8. Gegen unser Erwarten gelang es nicht, mit Adrenochrom die Glykogensynthese hemmende Wirkung des Adrenalins bei Abwesenheit von Insulin nachzuahmen. Von acht bisherigen Versuchen (Tabelle 7) waren sechs ganz negativ, obwohl sie jeweils mit frischen Adrenochromlösungen angesetzt waren. Wenn dies richtig ist, dann ist man gezwungen anzunehmen, daß die synthesehemmende Wirkung des Adrenalins, soweit es sich nicht um den Antagonismus zum Insulin handelt, nicht notwendig über Adrenochrom geht. Für den Insulinantagonismus des Adrenalins in unseren Versuchen erscheint jedenfalls eine Zwischenrolle des Adrenochroms möglich.

9. Im Zusammenhang der Überlegungen zu der uns beschäftigenden Frage, wurde auch untersucht, ob nach vorheriger durch Insulin bedingter optimaler Synthese nachträgliche Adrenalineinwirkung das gebildete Glykogen wieder abbaut. Nachdem beide Zwerchfellhälften eine Zeit lang mit Insulin gehalten waren (z. B. 120 Min.), wurde die eine aus der insulinhaltigen Lösung herausgenommen und in eine nur adrenalinhaltige gegeben. Beide Hälften blieben dann noch weiter,

Tabelle 7. *Vergleich Glukose mit und ohne Adrenochrom.*

Versuchs-Nr.	Glukose	Glukose Adrenochrom	Differenz	Glukose %	Adrenochrom γ
86	698	378	−320	0,25	100
87	469	557	+88	0,25	100
90	454	456	+2	0,5	100
91	616	727	+111	0,5	100
105	250	121	−129	0,25	100
106	575	572	−3	0,25	100
107	437	383	−54	0,5	100
108	555	539	−16	0,5	100
Mittel	507	466	−41 −8%		

Tabelle 8. *Glukose-Insulin mit nachträglicher Adrenalineinwirkung. Probe b nach den angegebenen Zeiten gegen eine adrenalinhaltige, aber insulinfreie Lösung gewechselt.*

Versuchs-Nr.	a Glukose Insulin (3 E)	b Glukose Insulin *dann* Adrenalin	Insulin	Adrenalin	Adrenalin	
			Zeiten in Minuten		γ	Differenz
35	1260	950	120	120	50	−310
45	1540	1120	120	120	50	−420
46	1130	1110	120	120	100	−20
42	660	460	90	60	50	−200
88	1182	1000	90	60	100	−182
89	935	763	90	60	100	−172
92	937	410	90	60	100	−527
93	682	591	90	60	100	−91
37	1390	1270	120	30	50	−120
Mittel	1079	741				−338 −31%

z. B. 120 Min., bei 37° C im Sauerstoffstrom stehen. Wie Tabelle 8 lehrt, zeigt sich in den nachträglich mit Adrenalin behandelten Proben ein Minus von 31% im Mittelwert. Dies würde dafür sprechen, daß Adrenalin das unter Insulin aufgebaute Glykogen ebenso abbaut wie das präformierte (Tabelle 5). Ganz eindeutig sind diese Versuche nicht. Obwohl wir in einer Anzahl von besonderen Versuchen den Eindruck gewannen, daß nach 120 Min. das Maximum der Synthese erreicht ist, wäre es immerhin denkbar, daß in der noch insulinhaltigen Kontrolle in der zweiten Versuchsperiode der Aufbau noch fortschreitet, während er in der adrenalinhaltigen mindestens unterbrochen ist. Diese Versuche sollten in der Weise wiederholt werden, daß auch die Kontrollprobe am Schluß der ersten Periode in eine Insulin- und natürlich auch adrenalinfreie Ringerlösung gebracht wird.

Tabelle 9. *Chinon-Versuche mit und ohne Insulin.*

Versuchs-Nr.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Chinon	Differenz	Chinon γ	Glukose %
54	1130	1070	−60	50	0,25
55	1250	840	−410	100	0,25
56	1160	500	−660	200	0,25
60	1040	600	−440	100	0,25
61	1010	580	−430	200	0,25
Mittel	1118	718	−400 −36%		
Versuchs-Nr.	**Glukose**	**Glukose Chinon**	**Differenz**	**Chinon γ**	**Glukose %**
58	1080	740	−340	100	0,25
59	760	420	−240	200	0,25
Mittel	920	580	−340 −37%		

10. Im Hinblick auf die Chinonstruktur des Adrenochroms wurde geprüft, wie sich das gewöhnliche *Chinon* in unserer Versuchsanordnung ohne und mit Insulin verhält. Die Tabelle 9 zeigt, daß es in beiden Anordnungen fast ebenso stark wirkt wie Adrenalin und Adrenochrom. Wir zögern aber, diese Versuche den mit jenen Substanzen gemachten gleich zu setzen, weil die angewandten Chinondosen (50—200 γ) den Muskel, nach seinem stark veränderten Aussehen nach zu urteilen, geschädigt zu haben scheinen. Es liegt also vielleicht gar keine Reaktion mit dem Insulin, sondern nur eine Schädigungswirkung auf die Muskelzelle vor. Wenn man allerdings diese Erklärung für die Wirkung des Chinons in den angewandten Dosen annehmen will, dann müßte man sie folgerichtigerweise auch für das chinonartige Adrenochrom, ja selbst für das Adrenalin in Betracht ziehen, soweit es oxydiert wird. Indessen widerspricht die Annahme einer grob zellschädigenden Wirkung des Adrenalins in den von uns angewandten Konzentrationen (1 : 400000—1 : 100000) allem bisher Bekannten. Jedoch im Hinblick auf die von uns weiter unten diskutierte Hypothese des strukturalterierenden Wirkungsmechanismus des Adrenalins sind solche Überlegungen nicht ohne Interesse.

11. Brenzkatechin, als Kern des Adrenalins, erweist sich, wie Tabelle 10 lehrt, in den angewandten Dosen von 50—200 γ als unsicher wirksam gegenüber dem Insulin. Es ist bekanntlich nicht leicht zum Orthochinon oxydierbar.

Tabelle 10. *Versuche mit Insulin und Brenzkatechin.*

Versuchs-Nr.	Glukose Insulin	Glukose Insulin Brenzkatechin	Differenz	Brenzkatechin γ	Glukose %
74	500	409	−91	50	0,25
75	758	500	−258	100	0,25
79	781	760	−21	50	0,25
80	786	916	+130	200	0,25
81	830	686	−144	200	0,25
82	298	267	−31	200	0,25
83	642	693	+51	100	0,25
Mittel	656	604	−52 −7,9%		

Diskussion.

Der Versuch, die an sich ganz eindeutigen Ergebnisse zu einer Theorie des Insulin-Adrenalinantagonismus, so wie er in unseren Versuchen zur Darstellung kommt, auszuwerten, ist nicht ganz einfach. Die hemmende Wirkung des Adrenalins auf die Glykogensynthese in Abwesenheit von Insulin scheint, nach der Unwirksamkeit des Adrenochroms zu schließen, nicht an die vorherige Oxydation des Adrenalins

gebunden zu sein, obwohl die Versuchsbedingungen eine wenigstens partielle Oxydation ermöglichten. Wir führten oben aus, daß und warum diese Frage noch bestimmter weiterer Untersuchungen bedarf und zwar einerseits zur Klärung, ob die Wirkung etwa sofort eintritt und danach, trotz Oxydation des Adrenalins, noch längere Zeit sich geltend macht, und andererseits, ob nach absichtlich herbeigeführter vorheriger Oxydation des Adrenalins die Hemmung der Synthese (im insulinfreien Milieu) ausbleibt.

Der Antagonismus des Adrenalins gegenüber dem Insulin vollzieht sich auch dann, wenn es vorher oxydiert wurde, denn auch Adrenochrom wirkt stark hemmend auf den Insulineffekt.

Besonders bemerkenswert für die Deutung der Erscheinungen ist der erneut erbrachte Nachweis, daß auch der durch Adrenalin im *glukosefreien* Medium bewirkte Verlust an präformiertem Glykogen durch Insulin verhindert wird, unter Versuchsbedingungen also, die eine Glykogensynthese ausschließen.

Die Tatsache, daß Adrenalin, so wie es das präformierte Glykogen zu beschleunigtem Abbau bringt, auch den Aufbau des Glykogens aus Glukose in insulinfreier Lösung hemmt, macht es deutlich, daß diese Synthesehemmung durch die den Abbau anfachende Wirkung des Adrenalins verursacht ist. Wahrscheinlich liegen die Dinge so, daß Adrenalin in der Zelle Bedingungen schafft, die den fermentativen Abbau begünstigen und zugleich den fermentativen Aufbau hemmen. Dem Adrenochrom scheint, nach unseren bisherigen Ergebnissen, diese Wirkung nicht zuzukommen.

Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß Adrenalin auch das durch vorherige Insulinwirkung vermehrt angehäufte Glykogen (mindestens) zu einem Teil wieder zum Verschwinden bringt, was seiner oben geschilderten Wirkung auf das präformierte Glykogen entspricht.

Da sowohl Adrenalin als sein Oxydationsprodukt Adrenochrom die Insulinwirkung aufheben und andererseits die Adrenalinwirkung durch Insulin verhindert wird, so liegt es nahe anzunehmen, daß beide Substanzen, das Adrenalin und das Adrenochrom, mit dem Insulin in Reaktion treten und eine nach beiden Richtungen hin unwirksame Verbindung bilden. Diese Hypothese muß in weiteren systematischen Versuchen geprüft werden, um gegebenenfalls einer besseren Erklärung Platz zu machen.

Besonders wird man seine Aufmerksamkeit darauf richten müssen, ob nicht vielleicht kolloidchemische Veränderungen in der Zelle durch die Hormone bewirkt werden und zwar in dem Sinn, daß Adrenalin eine Strukturstörung herbeiführt, die die abbauenden Fermentwirkungen begünstigt, die aufbauenden schädigt, und ob Insulin durch

Stabilisierung der Struktur die assimilatorische Synthese begünstigt, den dissimilatorischen Zerfall dagegen zurückdämmt. Diese „Strukturtheorie" der Hormonwirkung, die der eine von uns (Riesser) in jüngster Zeit wiederholt in den Mittelpunkt allgemeiner stoffwechselphysiologischer Betrachtungen gestellt hat, sollte mit besonderer Methodik systematisch geprüft werden.

Zusammenfassung.

1. Am isolierten Rattenzwerchfell in glukosehaltiger sauerstoffdurchströmter Ringerlösung bei 37° wird in Bestätigung der Befunde von Gemmill sowie von Riesser erneut gezeigt, daß Insulin (2—3 E) die schon an sich unter diesen Bedingungen sich vollziehende Glykogensynthese erheblich verstärkt.

2. Diese Wirkung des Insulins wird durch gleichzeitigen Zusatz von 50—100 γ Adrenalin aufgehoben. Dies tritt ein, obwohl das Adrenalin nach der $2^1/_2$stündigen Versuchszeit weitgehend oxydiert sein sollte.

3. Es zeigt sich, daß unter sonst gleichen Bedingungen Adrenochrom die Insulinwirkung ebenso hemmt wie Adrenalin es tut. Dagegen konnte die im insulinfreien Ansatz durch Adrenalin bedingte Synthesehemmung durch Adrenochrom nicht reproduziert werden.

4. In Bestätigung der älteren Befunde von Riesser ließ sich zeigen, daß die durch Adrenalin in *glukosefreier* Lösung bewirkte Abnahme des präformierten Glykogens durch Insulinzusatz behoben wird, daß also ein klarer gegenseitiger Antagonismus besteht.

5. Nachträgliche Einwirkung von Adrenalin nach vorangegangener, durch Insulin bedingter Glykogenanhäufung bringt einen Teil dieses Glykogens wieder zum Verschwinden.

6. In der Diskussion wird die Hypothese erörtert, daß zwischen Adrenalin bzw. Adrenochrom und Insulin eine Verbindung entsteht, die selbst nach beiden Richtungen hin unwirksam ist. Auch die „Struktur"-Theorie der Hormonwirkungen wird zur Erklärung der Befunde herangezogen. Weitere Versuche zur Klärung der neu aufgetretenen Probleme werden angekündigt.

Literatur.

[1] Riesser, O.: Biochim. et Biophys. Acta **3**, 208 (1947). — [2] Gemmill, Ch. L.: Bull. Hopkins Hosp., Baltim. **66**, 232 (1940); **68**, 329 (1941). — [3] Gemmill, Ch. L. and L. Hamann: Bull. Hopkins Hosp., Baltim. **68**, 50 (1941). - [4] Cori, C. F.: Physiol. Rev. (Am.) **11** (1931). — [5] Riesser, O.: Helvet. med. Acta **9**, 720 (1942) **12**, 131 (1945). — [6] Colowick, S. P., M. S. Welch and C. F. Cori: J. biol. Chem. (Am.) **133**, 359 (1940). — Colowick, S. P., H. M. Kalckar and C. F. Cori: J. biol. Chem. (Am.) **137**, 343 (1941). — [7] Good, C. A., H. Kramer and M. Somogyi: J. biol. Chem. (Am.) **100**, 485 (1933). — [8] Sahyun, M.: J. biol. Chem. (Am.) **103**, 208 (1933). — [9] Verzár, F. et V. Wenner: Bull. Soc. Chim. biol. (Fr.) **29**, 304 (1947). — Biochem. J. **42**, 35 (1948).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Schütz).

Über die Wirkung des Äthylurethans auf Herzfrequenz und Elektrokardiogramm.

Von

Heinz Rodeck.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. März 1948.)

Einleitung und Fragestellung.

Bei Versuchen an mit Äthylurethan narkotisierten Tieren war uns aufgefallen, daß insbesondere bei Anwendung hoher Dosen Herzfrequenz und Ekg Veränderungen zeigten, die sich nicht durch methodisch bedingte Schädigungen des Herzens erklären ließen. Diese Befunde ließen den Plan aufkommen, die Beeinflussung von Herzfrequenz und Aktionsstrom durch wechselnde Dosen von Urethan systematisch zu prüfen, zumal das Urethan als Mitosegift bei der Behandlung der Leukämien u. ä. neuerdings erhöhte Beachtung gefunden hat.

Bei der Durchsicht der Literatur ergab sich, daß anscheinend auf Grund der alten Schmiedebergschen Auffassung[1], die Wirkung des Urethans auf das Herz sei gleich Null, über diese Frage relativ wenig gearbeitet wurde. Es seien jedoch in Kürze die Arbeiten aufgeführt, die sich mit den Wirkungen des Urethans auf das Herz befassen. Nach Dieballa[2] wird die Pulsfrequenz des isolierten Froschherzens durch Urethan nicht wesentlich beeinflußt. Es kommt jedoch mit steigender Urethankonzentration zur Abnahme der Hubhöhe. Die Veränderungen sind reversibel. Loewi[3] beobachtete mehr oder minder starke, reversible Tonussteigerung bis zur Kontraktur bei Einwirkung von 1%iger Urethan-Ringerlösung auf das an der Straubschen Kanüle isolierte Froschherz. Abnahme der Herzfrequenz von Anuren- bzw. Urodelenlarven nach Schwimmen der Larven in Urethanlösung beschreiben Schübel und Stöhr[4]. Nach Junkmann[5] verkürzt das Urethan die Refraktärphase. In stärkeren Konzentrationen traten Herzwühlen, starke Minderung der Kontraktilität und deutliche bis starke Herabsetzung der Erregbarkeit auf. Wind[6] berichtet über raschen Abfall der Hubhöhen des an der Straubschen Kanüle isolierten Froschherzens nach Füllung der Kanüle mit 2%iger Urethanlösung. Sehr bald erfolgte jedoch ein mehr oder weniger vollständiger Wiederanstieg. Kisch[7] sah deutliche Verlangsamung der nomotopen Reizbildung bei Injektion von 0,2—0,75 g in den Rückenlymphsack etwa 60 g schwerer Frösche nach etwa $^1/_4$ Stunde auftreten. Gelegentlich trat bei kleineren Fröschen auch Herzstillstand ein, wobei jedoch die Kammer durch mechanische Reizung noch leicht zur Kontraktion gebracht werden konnte. Nach v. Dongen[8] hatte Urethan (minimal wirksame Dosis 300 mg/kg intravenös) bei Kaninchen eine deutliche Wirkung auf das Herzflimmern und Nachflimmern und hob Heterotopien auf. Dagegen zeigte es keinen Effekt auf Refraktärphase und Überleitungszeit.

Methodik.

Um die Urethanwirkung auf Schlagfolge und Aktionsstrom des Herzens möglichst genau analysieren zu können, wurden mehrere Versuchsreihen mit unterschiedlicher Methodik angestellt. Es wurden insgesamt etwa 150 Versuche gemacht. In der ersten Anordnung diente das *isolierte, spontan schlagende Froschherz* als Untersuchungsobjekt. Der Aktionsstrom wurde mit dem kleinen Siemens-Elektrokardiographen registriert. Es wurden sowohl die Veränderungen des diphasischen als auch des monophasischen Aktionsstromes geprüft, wobei eine möglichst konstante Monophasie mit Hilfe der nach dem von E. Schütz[9] angegebenen Saugprinzip von K. E. Rothschuh[10] konstruierten Saugelektrode erzielt wurde. Teils fanden Straubsche Herzen Anwendung, zum größten Teil jedoch wurden die Herzen in die Prüflösung mit Urethan hineingelegt. Die Ableitung der Aktionsströme erfolgte mit Hilfe von unpolarisierbaren Zink-Zinksulfat-Wollfadenelektroden. Die angewandten Versuchslösungen enthielten wechselnde Mengen von Urethan in 0,65%iger Ringerlösung. Der osmotische Druck der Lösungen wurde mit Hilfe der Methode nach Beckmann (Gefrierpunktserniedrigung) bestimmt. Nebenstehende Lösungen fanden bei den Versuchen Anwendung.

Lösung	Urethangehalt %	Osmotischer Druck (bei 0° C) atm.
1	0,1	6,2
2	0,2	6,4
3	0,3	6,55
4	0,4	6,7
5	0,5	7,0
6	0,7	7,4

In der zweiten Versuchsanordnung wurde am *Ganztier* gearbeitet. Der Frosch wurde je nach Gewicht mit 0,75—2 cm³ einer 25%igen Äthylurethanlösung narkotisiert. Um eine schnelle Resorption zu erzielen, wurden mehrere subkutane Depots gesetzt und meist gleichzeitig ein Teil der Lösung der Magensonde gegeben. Trotzdem zeigte es sich oft noch nach Stunden, daß weder vom Magen noch aus dem Rückenlymphsack alles resorbiert war. Mitunter wurde auch die Narkose nach Thunberg[11] angewandt, wobei dem Tier Urethankr stalle auf die Rückhaut gestreut werden, und die Narkose durch Resorption des Urethans durch die Haut eintritt. Nach genügender Narkosetiefe wurde unter möglichst unblutigem vorsichtigen Präparieren der Thorax über dem Herzen eröffnet und so bei intaktem Kreislauf direkt vom Herzen abgeleitet. Auch hier wurden sowohl Versuche mit monophasischer als auch mit diphasischer Ableitung gemacht. Als Versuchstiere dienten einheimische Temporarien und Eskulenten. Die Versuche wurden von November 1946 bis Juni 1947 bei einer Zimmertemperatur von etwa 20° C durchgeführt.

Ergebnisse.

1. Veränderungen des Aktionsstromes.

Der *monophasische Aktionsstrom* (Abb. 1) zeigt bei zunächst geringer Frequenzabnahme schon meist zu Beginn der Versuche eine Tendenz zur Verlängerung, die schon nach wenigen Minuten Einwirkungsdauer immer deutlicher wird. Gleichzeitig nimmt der Anstieg einen schrägeren Verlauf. Plateauveränderungen im Sinne einer Plateauabnahme sind in der Regel nicht zu beobachten. Wenn sie auftreten, dann meist erst nach relativ langer Versuchsdauer bzw. bei Verwendung hoher Urethankonzentrationen. Besonders auffallend ist die starke Verlängerung der Überleitungszeit (PQ-Dauer). Die PQ-Verlängerung

ist häufig so stark, daß bei etwa gleichbleibender Frequenz und nicht sehr großem zeitlichen Abstand der einzelnen Herzaktionen die

Abb. 1. Verhalten des monophasischen Aktionsstromes unter Einwirkung von 0,3 %iger Äthylurethan-Ringerlösung (isoliertes Froschherz). a nach Einwirken von 3 Min. Ringerlösung; b—h nach 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 Min. 0,3 %iger Äthylurethan-Ringerlösung. (Versuch 69, 11. Juli 1947.)

P-Zacke immer mehr in den vorangehenden monophasischen Aktionsstrom hereinrückt. Während bei Verwendung stärkerer Konzentrationen bzw. nach längerer Einwirkungszeit die Aktionsstromverlängerung langsam wieder zurückgehen kann, hält sich die Verlängerung der PQ-

Dauer über eine viel längere Zeit. Infolge der später fast regelmäßig einsetzenden Frequenzverlangsamung rücken die Herzaktionen auseinander und die P-Zacke klettert gleichsam den monophasischen Aktionsstrom wieder herab. Häufig zeigt die P-Zacke nach längerer Urethaneinwirkung Aufsplitterung, Erhöhung und Verbreiterung. In Hinblick auf den unterschiedlichen Urethangehalt der verwendeten Lösungen ist zu bemerken, daß mit steigender Konzentration die geschilderten Veränderungen (PQ- und QT-Verlängerung) eher auftreten, daß sie aber nicht so große Ausmaße erreichen wie bei den niedrigen Konzentrationen. Zudem macht eine anfängliche QT-Verlängerung dabei häufig trotz Frequenzabnahme später einer Verkürzung Platz.

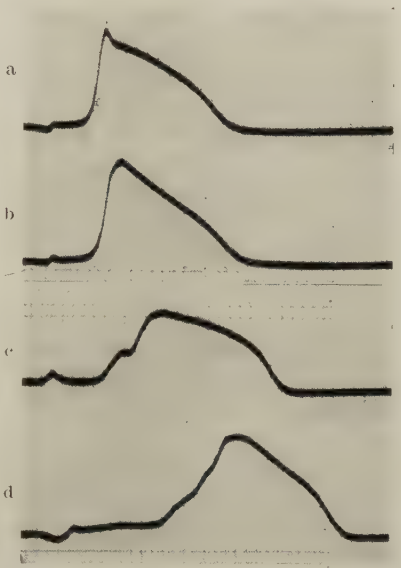


Abb. 2. Verhalten des monophasischen Aktionsstromes beim Ganzfrosch unter Äthylurethannarkose (R. temporaria, ♂, Gewicht 45 g, 1 cm³ 25 %ige Äthylurethanlösung). a 10 Min. nach Narkosebeginn; b 30 Min. nach Narkosebeginn; c 60 Min. nach Narkosebeginn; d 100 Min. nach Narkosebeginn. (Versuch 43, 6. Mai 1947.)

Im Prinzip unterscheiden sich die Ergebnisse, welche am monophasischen Aktionsstrom des isolierten Froschherzens gewonnen wurden, wenig von denen bei monophasischer Ableitung am Herzen des Ganztieres (Abb. 2). Nur ist im letzten Fall die Verlängerung des Aktionsstromes selten so hochgradig und hält meist nicht so lange an wie am isolierten Froschherzen — unter der Voraussetzung natürlich, daß nicht zu stark narkotisiert war. Fast stets jedoch ist zu bemerken, daß der Anstieg des monophasischen Aktionsstromes besonders stark verzögert ist. Die Abnahme der Erregungsgröße ist bei Versuchen am Ganzfrosch nicht so stark ausgesprochen, wie am isolierten Herzen. Das ist jedoch weniger auf eine Urethanwirkung zurückzuführen, als vielmehr darauf, daß jedes isolierte Herz schon unter normalen Bedingungen nach kurzer Zeit einen stärkeren Verlust der Erregungsgröße aufweist als ein Herz im Ganztier.

Daß die Aktionsstromveränderungen auch unabhängig von den Frequenzänderungen eintreten, konnte durch Versuche am mit konstanter Frequenz gereizten Froschherzen gezeigt werden. Besonders auffallend ist die Reversibilität der Aktionsstromveränderungen, die

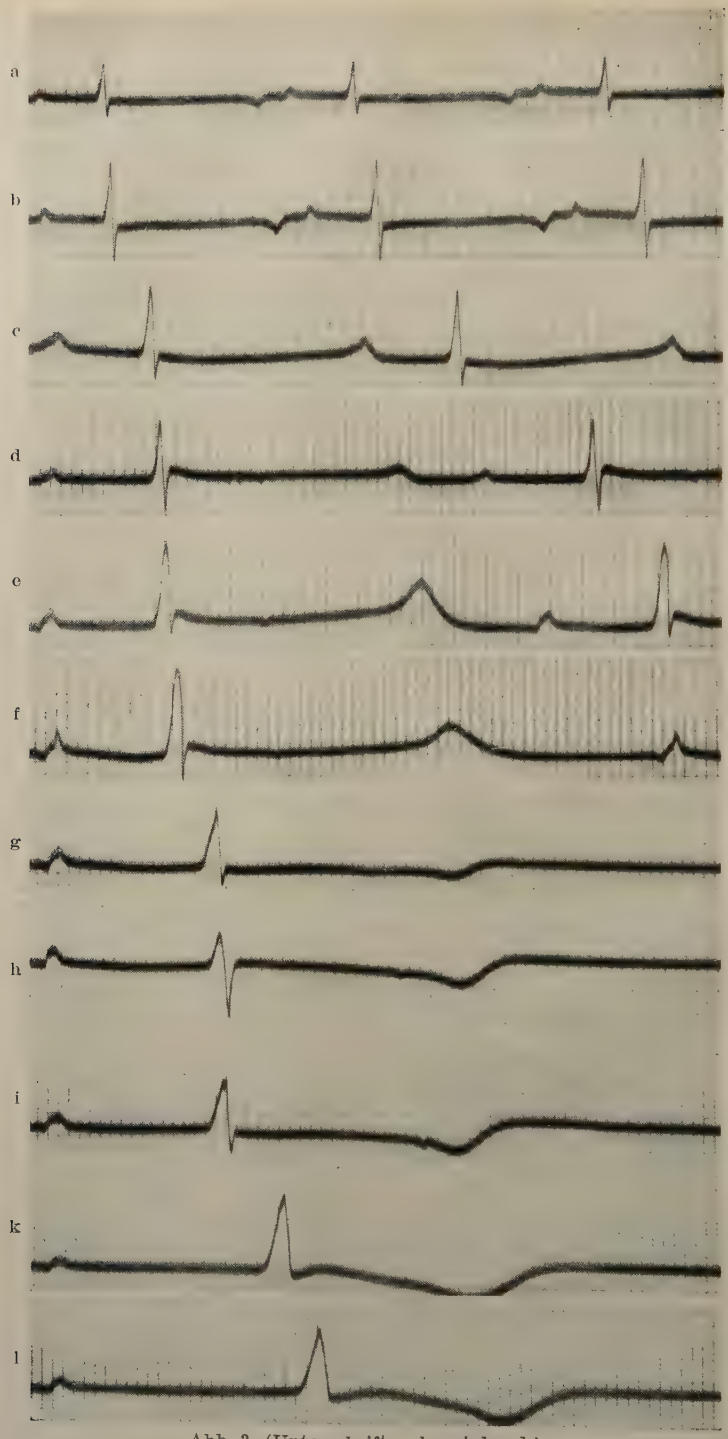


Abb. 3. (Unterschrift nebenstehend.)

bei nicht zu hohen Urethandosen bzw. zu langer Einwirkungszeit häufig schon nach einer Verweildauer des isolierten Herzens von einigen Minuten in Ringerlösung eintritt.

Die Veränderungen des *diphasischen Aktionsstromes* des isolierten spontan schlagenden Herzens sind gleichfalls sehr charakteristisch (Abb. 3). Auch hier tritt als auffallendste Folge der Urethanwirkung die Verlängerung des Aktionsstromes klar in Erscheinung. Bei relativ wenig veränderter Frequenz während der ersten Minuten rückt hier gleichfalls infolge der Verlängerung der Überleitungszeit häufig die P-Zacke in das Aktionsstrombild des vorangehenden Erregungsablaufes hinein (Abb. 3c). Aufsplitterung und Verbreiterung der P-Zacke treten fast regelmäßig nach längerer Urethaneinwirkung in Erscheinung. Der QRS-Komplex zeigt sich in fast allen Fällen verbreitert. Monophasische Deformierung des diphasischen Aktionsstromes tritt in ausgesprochener Form selten und dann nur bei höheren Konzentrationen ein. Angedeutet oder auch weniger stark ausgeprägt zeigt sie sich nach längerer Einwirkungszeit jedoch häufiger. Die T-Zacke ist dem übrigen Aktionsstrombild entsprechend regelmäßig verbreitert. Auffallend ist hier wie auch schon bei den Versuchen mit monophasischer Ableitung die Häufigkeit des Auftretens von Blockerscheinungen zwischen Vorhof und Kammer, wobei der totale Block überwiegt. Dabei ist die Kammer noch meist mechanisch erregbar, was auch schon Kisch[7] festgestellt hat. Die angeführten Veränderungen des diphasischen Aktionsstromes sind in den meisten Fällen reversibel, selbst Blockierungen der Erregungsleitung können mitunter rückgängig gemacht werden, wenn das Herz einige Zeit in reiner Ringerlösung verbracht hat. Interessant ist, daß gelegentlich bei relativ geringem Urethangehalt in der Ringerlösung manche Veränderungen sowohl des diphasischen als auch des monophasischen Stromes nach einiger Zeit trotz weiteren Verweilens der Herzen in der Urethanlösung zurückgehen.

Am Aktionsstrom des Ganztieres sind entsprechende Veränderungen zu verzeichnen (Abb. 4). Nur treten sie oft viel stärker in Erscheinung, als am isolierten Herzen. Die P-Zacke wird mitunter diphasisch oder auch negativ. Insbesondere fällt hier die oft sehr starke Verbreiterung der R-Zacke auf. Häufig ist auch eine ausgesprochene monophasische Deformierung zu sehen. Bei längerer Dauer kommt es auch hier zum totalen Block, wenn auch nicht so häufig wie beim isolierten Herzen. Bei Fröschen, die nicht so stark narkotisiert sind (0,5—1,0 cm^3), kann, wenn auch erst nach Stunden, völlige Erholung eintreten.

Abb. 3. Verhalten des diphasischen Aktionsstromes unter Einwirkung von 0,3 %iger Äthylurethan-Ringerlösung (isoliertes Froschherz). a nach Einwirken von 3 Min. Ringerlösung; b—l nach 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 Min. 0,3 %iger Äthylurethan-Ringerlösung. (Versuch 48, 28. Mai 1947.)

2. Veränderungen der Herzfrequenz.

Die Schlagfolge des Herzens ist während der ersten Minuten Einwirkungszeit der Lösungen mit etwas heraufgesetztem Urethangehalt oft nur wenig beeinflußt — wenngleich auch hier schon eine Tendenz zur Herabsetzung der Frequenz mitunter angedeutet sein kann. Erst nach einiger Zeit tritt eine immer stärker werdende Frequenzabnahme ein. Bei Anwendung der stärker mit Urethan versetzten Lösungen ist eine deutliche Frequenzverminderung von vornherein zu verzeichnen.

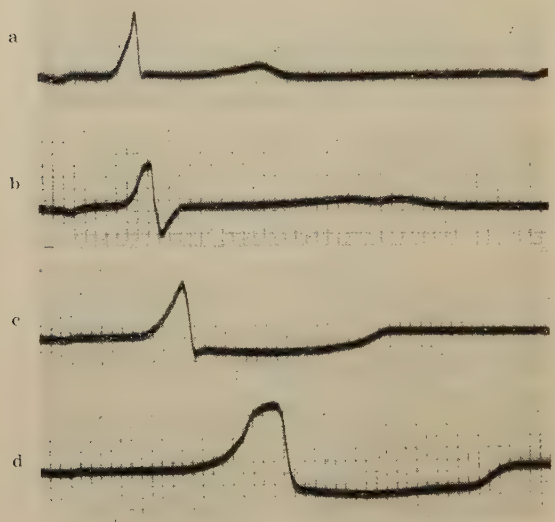


Abb. 4. Verhalten des diphasischen Aktionsstromes beim Ganzfrosch unter Äthylurethannarkose (R. temporaria, ♂, Gewicht 41,5 g 1 cm³ 25 %ige Äthylurethanlösung). a 10 Min. nach Narkosebeginn; b 30 Min. nach Narkosebeginn; c 60 Min. nach Narkosebeginn; d 100 Min. nach Narkosebeginn. (Versuch 22, 28. April 1947.)

Eine Dissoziation im Verhältnis von Frequenz und Aktionsstromdauer, die einen besonders feinen Indikator für die ausgesprochene Toxizität von Lösungen darstellt[12], wird bei den niedrigen Konzentrationen selten beobachtet. Frequenz und Aktionsstromdauer zeigen zwar Veränderungen im Sinne von Frequenzabnahme bzw. Aktionsstromverlängerung, aber das physiologische Verhältnis ist nicht gestört, d. h. die Veränderungen von Frequenz und Aktionsstromdauer verhalten sich umgekehrt proportional zueinander. Dagegen kommt es bei Anwendung höherer Urethankonzentration fast stets zu einem unphysiologischen Verhältnis von Frequenz und Aktionsstromdauer. Während die Frequenz sinkt, zeigt sich eine immer stärker werdende Aktionsstromverkürzung. Diese Dissoziation tritt jedoch in der Regel nicht sofort, sondern meist erst nach einigen Minuten Einwirkungszeit ein. Abb. 5 zeigt die Veränderungen von Frequenz und Aktionsstromdauer unter Urethanwirkung. Die PO-Dauer zeigt dagegen meist eine langsame, stetige Verlängerung. Innerhalb der ersten halben Stunde Einwirkungszeit verhalten sich Frequenz und QT-Dauer umgekehrt proportional zueinander, d. h. mit abnehmender Frequenz nimmt die QT-Dauer zu, wobei jedoch auch hier zu Beginn des Versuches auffällt,

daß zunächst der Aktionsstrom eine gelegentlich sehr starke Verlängerung aufweist, die zu der Frequenzverlangsamung in keinem Verhältnis steht. In der zweiten halben Stunde tritt infolge der langen Einwirkungszeit allmählich und immer deutlicher die Dissoziation zu Tage, d. h. mit abnehmender Frequenz tritt Aktionsstromverkürzung ein. Die PQ-Dauer zeigt dagegen meist eine langsame, stetige Verlängerung.

Besprechung der Ergebnisse.

Wenn wir die vorliegenden Befunde auf die Membrantheorie zurückführen, so können wir feststellen, daß Äthylurethan membrandichtend wirkt — eine Feststellung, die schon HÖBER[13] für das Absinken des

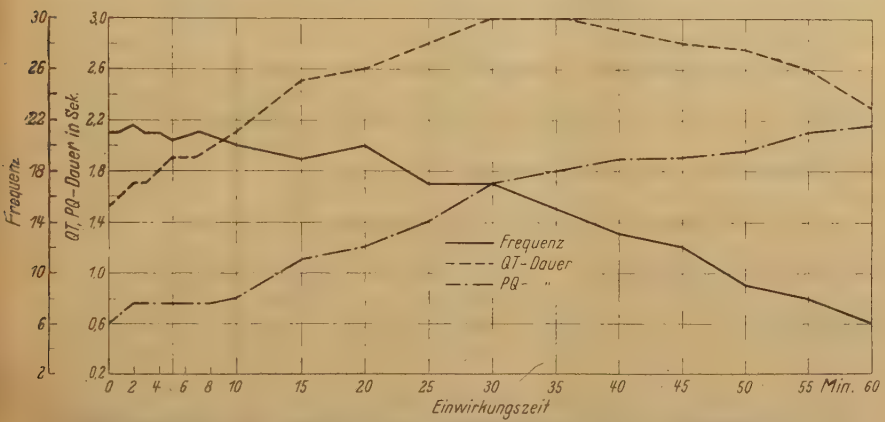


Abb. 5. Verhalten von Frequenz und Aktionsstromdauer unter Einwirkung von 0,5%iger Äthylurethanlösung (isoliertes Froschherz). (Versuch 71, 15. Juli 1947.)

Salzruhestromes durch Narkotika gemacht hat. SEO[14] arbeitete HÖBERs Versuche weiter aus und kam zum gleichen Ergebnis. Versuche von ANSELMINO[15] über die Zusammenhänge von Permeabilität von Kollodiummembranmodellen und Narkose zeigten, daß es bis zur völligen, aber reversiblen Dichtung kommen kann, und führten zu dem Schluß, daß die Poren durch Adsorption des Narkotikums an die Porenwand mechanisch verengt werden, und daß auf diese Weise eine Permeabilitätsherabsetzung zustande kommt. In einer späteren Arbeit[16] über die Beeinflussung der elektromotorischen Wirksamkeit von Kollodiummembranen durch Narkotika fand er einen erheblichen Potentialabfall, sowohl der chemischen wie auch der Konzentrationspotentiale.

Unsere Befunde stimmen gut mit diesen Ergebnissen überein. Bezugnehmend auf die Membrantheorie kommen wir zum gleichen Resultat wie die oben genannten Autoren. Urethan hemmt den gesamten Erregungsablauf im Sinne einer Membrandichtung. Dafür sprechen

Verlängerung des gesamten Aktionsstromes, Verbreiterung und Aufsplitterung der P-Zacke, verzögerter Anstieg des monophasischen Aktionsstromes bzw. der R-Zacke, Verbreiterung des QRS-Komplexes, Verbreiterung der T-Zacke. Alles das sind Erscheinungen eines verzögerten Anstieges der Erregung, einer verlangsamten Erregungsleitung und eines verzögerten Abklingens der Erregung.

Die eigenartige Erscheinung, daß trotz weiterer Urethaneinwirkung unter Umständen eine Rückbildung der Veränderungen eintreten kann, dürfte vielleicht auf eine „Gewöhnung" des Gewebes an das Urethan aufzufassen sein — eine Beobachtung, die bereits Hecht[17] am durch Urethan beeinflußten Kaninchendarm gemacht hat und durch Steigerung des nutzbaren Energievorrates während der Narkose erklärt. Damit stimmen gleichfalls die Befunde Winds[6] überein, der nach einem durch Urethan bedingten Abfall der Hubhöhe des isolierten Froschherzens nach kurzer Zeit einen mehr oder minder vollständigen Wiederanstieg sah. — Während anfänglich PQ- und QT-Dauer in gleicher Weise eine deutliche Verlängerung aufweisen, kommt es bei stärkeren Urethandosen später mitunter wieder zur Abnahme der QT-Dauer, während die Überleitungszeit ihre Verlängerung noch über eine längere Zeit beibehalten kann. Entweder ist dieses unterschiedliche Verhalten auf eine bessere „Gewöhnung" des intraventrikulären Leitungssystems gegenüber dem Überleitungsgewebe zurückzuführen, oder aber die Kammer zeigt sich gegenüber der nach längerer Einwirkung auftretenden, nun unter Umständen toxischen Wirkung des Urethans weniger resistent als der Vorhof. — Der zunächst seltsam anmutende Befund, daß die P-Zacke in den vorangehenden Aktionsstrom hineinfällt, ist nicht weiter verwunderlich, wenn man sich vor Augen hält, daß die Frequenz während der ersten Minuten Einwirkungszeit meist nur wenig abnimmt, während der Aktionsstrom häufig schon eine starke Leitungsverzögerung aufweist.

Im übrigen scheint Urethan in nicht allzu starken Konzentrationen und bei nicht zu langer Einwirkungszeit nicht als ausgesprochenes Zellgift am Herzen zu wirken. Es wirkt in erster Linie im Sinne einer Membrandichtung hemmend auf den Erregungsablauf. Dafür sprechen verschiedene Befunde und zwar zunächst einmal die Reversibilität der Veränderungen, dann die „Gewöhnung" und der nur unbedeutende Plateauverlust des monophasischen Aktionsstromes. — Die Unterschiede zwischen den Befunden am isolierten Froschherzen und am Herzen des Ganzfrosches sind wahrscheinlich auf die gleichfalls durch Urethan veränderten Einflüsse der Herznerven zurückzuführen. Die gelegentlich auftretende, anscheinend bessere „Gewöhnung" des Ganzfrosches läßt sich durch die Entgiftungs- (Leber!) und Ausscheidungsmöglichkeiten des intakten Organismus erklären.

Bezüglich der Dosierung des Urethans bei Kaltblüterversuchen ist also festzustellen, daß die meist angegebene Menge (1 cm³ 25%ige Urethanlösung auf 50 g Frosch) für Versuche, bei denen es auf den Aktionsstrom nicht ankommt, nicht zu hoch ist. Urethan wirkt in der angegebenen Dosierung weniger auf die Frequenz, dagegen unter Umständen schon etwas auf den Erregungsablauf. Bei Versuchen, in denen es also auf das Ekg ankommt, muß man daher vorsichtig sein. Es empfiehlt sich, die meist angegebene Dosierung etwas herabzusetzen und zwar auf etwa 0,7—0,8 cm³ 25%ige Urethanlösung auf 50 g Frosch. Hierbei traten bei unseren Versuchen keine Aktionsstromveränderungen auf — es sei denn, daß die Versuche sich sehr lange hinzogen und die Veränderungen weniger speziell auf das Urethan als vielmehr auf den allgemeinen Zelltod zurückzuführen waren. Man muß allerdings dabei berücksichtigen, daß bei unseren Versuchen das Urethan in mehreren Depots gesetzt wurde, so daß ein schnellerer Übertritt in das Tier erfolgte als es gewöhnlich bei Spritzen von 1 cm³ in den Rückenlymphsack der Fall ist.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung des Äthylurethans auf Herzfrequenz und Ekg geprüft. Auf Grund der Befunde ist festzustellen, daß Urethan im Sinne einer Membrandichtung den gesamten Erregungsablauf verzögert und sich auf die Schlagfolge des Herzens hemmend auswirkt. Das erregungsleitende System erweist sich empfindlicher gegen Urethan als die reizbildenden Zentren. In der meistangegebenen Konzentration (1 cm³ 25%ige Urethanlösung für 50 g Frosch) entfaltet Äthylurethan nach einiger Zeit bereits Wirkungen auf das Ekg, während die Frequenz noch unbeeinflußbar ist.

Im Anschluß an diese Kaltblüterversuche wurden einige orientierende Versuche an Warmblütern (Katzen, Meerschweinchen und Mäusen) gemacht. Es zeigte sich nach intravenöser Dauerinfusion einer 25%igen Urethanlösung, daß das Katzenherz gegenüber Urethanzufuhr sehr resistent ist. Das gleiche gilt auch von den Meerschweinchen bzw. Mäusen, denen das Urethan subkutan bzw. intramuskulär gespritzt wurde. Auf die Dauer traten auch hier Frequenzverlangsamung und Aktionsstromverlängerung auf. Wenn die Urethanzufuhr unterbrochen wurde und das Herz noch nicht zu stark geschädigt war, erholte es sich nach oft recht kurzer Zeit. Bei einem in relativ kurzer Zeit erfolgten starkem Urethanzufluß kam es zu monophasischer Deformierung, die jedoch immer nach wenigen Minuten zurückging.

Schließlich erlagen die Tiere dem Urethan, wobei einige Male, insbesondere bei Katzen, Herzwogen auftrat. Die Urethandosen überstiegen dabei die Normaldosen um ein Vielfaches. Hinsichtlich dieser Warmblüterversuche kann man feststellen, daß Warmblüter gegenüber Äthylurethan relativ widerstandsfähiger sind als Kaltblüter, und daß Äthylurethan sich daher bei elektrokardiographischen Versuchen mit Warmblütern in den gebräuchlichen Dosen[18] als ausgezeichnetes Narkosemittel erweist.

Literatur.

[1] Schmiedeberg, O.: Arch. exper. Path. (D.) **20**, 203 (1886). — [2] Dieballa, G.: Arch. exper. Path. (D.) **34**, 137 (1894). — [3] Loewi, O.: Pflügers Arch. **187**, 105 (1921). — [4] Schübel, K. u. P. Stöhr: Arch. exper. Path. (D.) **104**, 87 (1924). — [5] Junkmann, K.: Arch. exper. Path. (D.) **108**, 149 (1925). — [6] Wind, F.: Arch. exper. Path. (D.) **116**, 135 (1926). — [7] Kisch, B.: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. VII/1, S. 762. Berlin: Springer 1926. — [8] Dongen, K. v.: Acta brev. neerl. Physiol. etc. **7**, 26 (1937). Ref. Ber. Physiol. **101**, 496 (1937). — [9] Schütz, E.: Klin. Wschr. **1931 II**, 1454. — [10] Rothschuh, K. E.: Z. exper. Med. **110**, 154 (1942). — [11] Thunberg, T.: Skand. Arch. Physiol. (D.) **45**, 166 (1924). — [12] Rodeck, H.: Pflügers Arch. **250**, 91 (1948). — [13] Höber, R.: Pflügers Arch. **120**, 492 (1907). — Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 6. Aufl. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1926. — [14] Seo, T.: Pflügers Arch. **206**, 485 (1924). — [15] Anselmino, K. J.: Pflügers Arch. **220**, 524 (1928). — [16] Anselmino, K. J.: Pflügers Arch. **220**, 633 (1928). — [17] Hecht, K.: Arch. exper. Path. (D.) **113**, 338 (1926). [18] Haberland, H. F. O.: Die operative Technik des Tierexperimentes. Berlin: Springer 1926.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Cholerese durch synthetische Mittel.

I. Mitteilung.

Quantitativer und qualitativer Effekt des Phenylmethylcarbinols bei der Ratte.

Von

Werner Kalow.

(Eingegangen am 15. März 1948.)

Das therapeutische Bedürfnis nach gallensekretionssteigernden Mitteln erfordert wegen des Mangels an tierischer Galle den Einsatz synthetischer Medikamente. Ein Naturstoff, der choleretisch wirkt, und der synthetisch herstellbar ist, ist das p-Tolylmethylkarbinol. Es ist das wirksame Prinzip einer Kurkumawurzel, die früher aus Java eingeführt wurde.

Koch[1] hatte 1927 das Interesse für diese Droge in Deutschland geweckt, die die Malaien seit langem als Heilmittel gegen Lebererkrankungen gebrauchten. Es handelt sich um den Wurzelstock der Zingiberazee *Curcuma domestica*. Er wird „gelbe Wurzel", auf malaiisch „temoe lavac" genannt. In die niederländische Pharmakopoe war diese Droge bereits 1904 aufgenommen worden, in Deutschland wurde sie nach Kochs Anregung näher untersucht. Guttenberg, Kalk und Nissen[2] prüften die arzneiliche Wirkung von Gesamtextrakten der Temoelavac. Später fand Grabe[3] als wirksames Prinzip der Droge das p-Tolylmethylkarbinol. Diese Substanz wirkt choleretisch, also gallensekretionssteigernd. Daß außerdem ein Cholagogum in dieser Droge gefunden wurde, sei hier nur nebenbei erwähnt. Es ist der Farbstoff Curcumin (Diferuloylmethan), der ausschließlich die Kontraktion der Gallenblase fördert[4].

Als synthetisch leicht herstellbares niederes Homologes des Tolylmethylkarbinols untersuchte ich das Phenylmethylkarbinol *. Die Tatsache, daß auch diese Substanz choleretisch wirkt, ist nicht neu.

Bereits Fromherz[5] prüfte sie neben anderen Verbindungen und kam zu dem Schluß, daß Aryl-alkyl-karbinole und außerdem Alkylamide aromatischer Säuren bei der Ratte einen starken spezifischen Effekt hatten. Doch beurteilte er den Wert dieser Substanzen skeptisch, da sie sich am Kaninchen als nicht wirksam erwiesen. In der II. Mitteilung dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß die Bedenken von Fromherz für die Frage der Anwendbarkeit des Präparates in der Klinik keine Rolle spielen dürften.

* Diese Substanz, sowie das in der folgenden Arbeit benutzte Tolylmethylcarbinol erhielt ich durch die freundliche Vermittlung von Herrn Direktor Dr. Boedecker von der Firma Riedel-de Haën A. G. Den Genannten sei auch an dieser Stelle herzlich gedankt.

Aus grundsätzlichen Erwägungen und im Hinblick auf die praktische Anwendung dieser Substanz ist es jedoch angebracht, nicht nur von der Tatsache des choleretischen Effektes zu wissen, sondern auch ihre noch unbekannte Wirkung auf die Gallequalität zu kennen. Wenn etwa nur die Ausscheidung von Gallenfarbstoff gefördert würde ohne gleichzeitige vermehrte Sekretion der Gallensäuren, so hätte z. B. die Verabreichung von Phenylmethylkarbinol keinen Sinn bei Colitis mit Fettresorptionsstörungen, einer von TEETER[6] besonders herausgestellten Indikation für die Anwendung von Cholereticis. Es wurde also die Art der Cholerese nach Anwendung von Phenylmethylkarbinol an der Ratte näher untersucht.

Methodik.

Die Gewinnung der Galle.

Weiße, ungefähr 200 g schwere Ratten, die mit Küchenabfällen und Hafer aufgezogen waren, blieben 12 Stunden nüchtern, bevor sie mit Urethan 1,2 g/kg subkutan narkotisiert wurden. Dann wurde eine Glaskapillare in den Ductus hepaticus eingebunden und danach eine Schlundsonde entweder nach GRABE[3] in den Magen eingeführt oder nach FROMHERZ[5] direkt ins Duodenum gebunden. Die Methode von FROMHERZ hat den Vorteil, daß der Effekt eines Choleretikums schneller und schon bei geringerer Dosierung einsetzt. Die von GRABE geforderte Tracheotomie vor Einführung der Magensonde kann man oft vermeiden, wenn man das Maul der Ratte mit einem geeigneten Sperrinstrument weit offen hält. Einige Tiere wurden nach dem Versuch nicht getötet. Sie lebten länger als 24 Stunden nach dem Eingriff.

Die Untersuchung der Galle.

1. Das Gallevolumen wurde durch Tropfenzählung bestimmt, da für die vorliegende Untersuchung Vergleichswerte ausreichen. Die Fehler, die durch Wechsel der Tropfengröße infolge einer Veränderung der Oberflächenspannung und des spezifischen Gewichts der Galle auftreten, sind so klein, daß sie vernachlässigt werden können, wie man aus den im Text folgenden Angaben über die Oberflächenspannung berechnen kann.

2. Zur Bestimmung des Trockengehaltes wurde die bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Galle gewogen.

3. Die Bestimmung des spezifischen Gewichts erfolgte pyknometrisch.

4. Die Oberflächenspannung der Galle wurde mit Hilfe der kapillaren Steighöhe in relativen Werten bestimmt. Eine selbst ausgezogene Glaskapillare wurde in zwei Stücke zerschnitten, das eine Kapillarstück senkrecht in eine Galleportion gehalten und die Steighöhe in Millimeter gemessen. Nach Ausblasen der Galle wurde in demselben Röhrchen die Steighöhe von destilliertem Wasser bestimmt. Da die vollkommene Reinigung und Trocknung einer Kapillare schwierig ist, folgte die gleiche Messung in umgekehrter Reihenfolge im zweiten Stück der gleichen Kapillare. Ungleichmäßigkeiten des Lumens können dabei Fehler verursachen. Deshalb wurde jede Messung stets mit mindestens drei Kapillaren verschiedener Weite wiederholt. Die Weiten waren so gewählt, daß destilliertes Wasser etwa 30, 50 oder 80 mm in den Rohren stieg. Das prozentuale Mittel der Einzelergebnisse wurde verwertet. Zu jeder Bestimmung diente ein frischer Satz von Kapillaren.

5. Der Gallenfarbstoffgehalt wurde im HAVEMANNschen Photozellenkolorimeter mit Verwendung des Schottfilters GG 3 kontrolliert. Die Galle wurde dazu direkt in destilliertem Wasser oder in 96%igem Alkohol aufgefangen. Durch 3 verschiedene Verdünnungen der vor der Medikamentengabe erzielten Galle wurde jedesmal eine Eichkurve angelegt. Danach ließ sich die relative Menge des Pigments in der nachher gewonnenen Galle messen, da der Farbton gleich blieb und nur die Farbtiefe veränderlich war. Der durch verhältnismäßig rasches Ausbleichen des Gallefarbstoffes in wäßriger Lösung mögliche Fehler ließ sich durch Kühlen der Gallelösung, durch schnelles Arbeiten und durch Einhalten gleicher zeitlicher Abstände zwischen der Gallenentnahme und Messung ausschalten. Die Kontrolluntersuchungen in alkoholischer Lösung zeigten gleiche Werte.

6. Zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren wurde durch ALDRICH und BLEDSOE[7] die PETTENKOFERsche Reaktion ausgearbeitet. Diese Methode lag den hiesigen Messungen der Gesamtabsorption im Photozellenkolorimeter zugrunde. Auf die von den Autoren angewandte Beseitigung der Gallepigmente mittels Adsorption an Kohle wurde verzichtet, weil damit erstens eine Fehlerquelle durch die mögliche Adsorption von Gallensäuren entsteht[8] und zweitens die gegen über den intensiven Farben der PETTENKOFERschen Reaktion leichte Gelbfärbung der Galle nicht ins Gewicht fällt.

Eine bestimmte Anzahl von Galletropfen (4—10) fielen in 2 cm³ konzentrierter Schwefelsäure, dann wurden 0,08 cm³ einer verdünnten Rohrzuckerlösung zugesetzt. Im Laufe von Stunden bildete sich ein dunkles Gelbrot, dann eine rote Farbe. Dabei zeigte sich im Spektrophotometer eine Absorption im kurzwelligen Teil des Spektrums, im ganzen blauen und violetten Bereich. Kontrollen mit der gleichen Schwefelsäure und Rohrzuckerlösung blieben hell braungelb. (Der Farbeffekt entstand bei Rattengalle nur mit konzentrierter Schwefelsäure, bei Katzengalle besser mit 60%iger Schwefelsäure. Dabei bildete sich ein violetter Farbton mit einem Absorptionsmaximum bei 540 m.) Reine Cholsäure gibt mit konzentrierter Schwefelsäure einen rotbraunen Farbton und grüne Fluoreszenz[9]. Diese Fluoreszenz wurde auch beobachtet, wenn die Rattengalle in der geschilderten Weise behandelt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen geblieben war. Es darf somit angenommen werden, daß die hier durchgeführte Form der Reaktion wirklich für Gallensäuren spezifisch ist.

Der Einfluß auf die Gallenmenge.

Aus der ersten Tabelle ist der choleresefördernde Einfluß des Phenylmethylkarbinols eindeutig zu entnehmen. Er scheint sogar stärker zu sein als der Effekt des Tolylmethylkarbinols, jedoch ist die Differenz nach den Zahlen der Tabelle noch nicht signifikant. Ein klarer Unterschied besteht aber gegenüber dem Toluol, das zur Kontrolle gereicht wurde. Es soll zwar aus den Tabellenangaben nicht geschlossen werden, daß dieses die Cholerese spezifisch hemmt, aber es darf gefolgert werden, daß eine chemische Reizung des Magen-Darmkanals keineswegs genügt, um die Gallensekretion anzuregen. (Man könnte auf diese Idee kommen, da sowohl Tolylmethylkarbinol als auch Phenylmethylkarbinol einen brennenden Geschmack auf der Zunge hinterläßt.) Daß das Lösungsmittel Paraffinum liquidum keinen eigenen Einfluß auf die Cholerese ausübt, war bereits von GRABE[3] festgestellt, und wurde in den Vorversuchen zu dieser Arbeit bestätigt.

Tabelle 1. *Choleretische Wirkung bei Ratten.*

Die angegebenen Tropfenzahlen beziehen sich auf die Galleausscheidung während 30 Min. einmal unmittelbar vor der Injektion, zweitens zur Zeit der höchsten Sekretionssteigerung. Der Zeitpunkt der maximalen Cholerese ist in Spalte 5 angegeben.

Substanz	Dosierung in mMol/kg	Dosierung in mg/kg	Maximaler Effekt nach Minuten	Tropfenzahl vor und nach Applikation	Steigerung in %	Durchschnitt %
A. Applikation durch die Schlundsonde in den Magen.						
Phenylmethylkarbinol	4	488	75	22—32	145	172
	4	488	60	11—22	200	
	3,5	427	60	10—18	180	
	3,5	427	75	10—16	160	171
	3,5	427	75	15—25	166	
	3,5	427	60	10—18	180	
	2	244	30	10—18	180	
	2	244	60	23—41	178	173
	2	244	30	10—16	160	
	0,1	12	45	10—14	140	
p-Tolylmethylkarbinol	3,5	476	30	14—18	128	
	2	272	30	14—18	128	
	2	272	60	11—15	136	156
	2	272	90	18—37	205	
	1,5	204	45	18—24	133	
Toluol	4	368	—	11—8	73	
	4	368	—	11—8	73	79
	4	368	—	12—11	92	
B. Durch eine Darmkanüle ins Duodenum.						
Phenylmethylkarbinol	2	244	30	26—45	173	
	0,66	81	30	15—39	260	
	0,2	24,4	30	9—14	156	
	0,05	6,1	15	30—43	143	
	0,025	3,0	45	20—23	115	

Für die Versuche mit geringer Dosierung war die duodenale Applikation des Phenylmethylkarbinols geeigneter als die Verabfolgung durch die Schlundsonde. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, haben 3 und erst recht 6 mg/kg noch einen deutlichen Effekt. Durch Vergleich der Tabellenteile A und B ist zu ersehen, daß die Schnelligkeit des Wirkungseintritts von der Art der Verabreichung abhängt. Der Ausgangswert der Gallensekretion ist bei duodenaler Applikation meist schon nach $1^1/_2$ Stunden wieder erreicht, bei Anwendung der Magensonde jedoch erst nach 2—4 Stunden.

Die Tabelle läßt weiterhin erkennen, daß die Zahl der Galletropfen von Ratte zu Ratte stark schwankt. Das beruht zwar zum Teil auf den

Tabelle 2. *Änderung der Rattengalle nach 2 mMol/kg Phenylmethylkarbinol.*

1. Trockengewicht der Galle, die während 30 Min. einmal unmittelbar vor der Injektion, zweitens zur Zeit der höchsten Sekretionssteigerung ausgeschieden wurde. Diese Angaben können mit den in Tabelle 1 gegebenen Werten direkt verglichen werden.

2. Je 10 Tropfen Galle, vor und nach Verabreichung des Phenylmethylkarbinols gewonnen, werden verglichen. a) Trockengewicht. b) und c) Aus den Meßtrommelwerten des Photozellenkolorimeters sind die Verhältniszahlen nach den jeweiligen Eichkurven berechnet. d) Oberflächenaktivität. Abnahme der Gallensäurenkonzentration erhöht die Oberflächenspannung.

	Gewicht in mg	Verhältnis in %	Mittelwert %
1. Trockengewicht der in 30 Min. ausgeschiedenen Galle	4,4:10,0	100:227	100:161
	8,6:14,9	100:173	
	7,1:10,1	100:142	
	5,2:5,4	100:104	
a) Trockengewicht von je 10 Tropfen Galle	8,4:7,2	100:86	100:94
	5,7:5,5	100:96	
	3,5:3,2	100:91	
	3,0:3,0	100:100	
b) Bilirubingehalt		100:75	100:55
		100:50	
		100:60	
		100:37	
c) Gallensäuregehalt (PETTENKOFERsche Reaktion)		100:97	100:92
		100:125	
		100:50	
		100:95	
d) Kapillare Steighöhe		100:93	100:106
		100:114	
		100:110	

individuellen Schwankungen der Gallenmenge, oft ist es aber technisch bedingt. Denn die Galle wurde durch selbst ausgezogene Glaskapillaren abgeleitet, die nicht immer den gleichen Durchmesser hatten. Damit war die Abtropffläche nicht konstant von gleicher Größe bei verschiedenen Versuchen. Die Abtropffläche beeinflußt aber die Tropfengröße.

Einige Versuche mit intraperitonealer Injektion zeigten, daß Phenylmethylkarbinol auch über diesen Anwendungsweg wirkt.

Der Einfluß auf die Gallequalität.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Versuchsergebnisse.

Der *Trockengehalt.* Die Galle wurde eine halbe Stunde lang vor und dann eine halbe Stunde lang nach Applikation des Phenylmethylkarbinols während der Zeit der höchsten Sekretionssteigerung gesammelt und nach Trocknung gewogen. Die gefundenen Werte in Milligramm sind aus der Tabelle zu ersehen. Sie wurden somit aus Untersuchungen in gleichen zeitlichen Abständen gewonnen wie die Werte für die Tropfenzahlen in Tabelle 1. Während dort die Galleförderung

73% betrug, berechnet als Steigerung der Tropfenzahl, ist das Gewicht der Trockensubstanz nur um durchschnittlich 61% vermehrt. Zur Kontrolle wurde das Trockengewicht nicht wie oben erwähnt je Zeiteinheit, sondern je Volumeneinheit der vor und nach der Injektion sezernierten Galle bestimmt. Das Ergebnis spricht für eine geringe Verdünnung der vermehrt ausgeschiedenen Galle, wie schließlich auch das vorher erwähnte Resultat.

Die Bestimmung des spezifischen Gewichts ergab im Mittel von 3 Fällen ein Absinken von 1028 auf 1022.

Zur Messung des *Pigmentgehaltes* der Galle wurde die Gelbfärbung einer bestimmten Anzahl der Tropfen vor und nach Applikation kolorimetrisch kontrolliert. Dabei zeigte sich ein ganz anderes Verhältnis als bei der Trockengewichtsbestimmung. Der Bilirubingehalt sank um durchschnittlich 45%. Das bedeutet, daß die Ausscheidung dieses Farbstoffs durch Phenylmethylkarbinol nur sehr viel weniger angeregt wird als die Sekretion anderer Gallebestandteile. Dies Verhalten ist gut verständlich, da die Leberparenchymzelle bei der Ausscheidung der Gallepigmente im wesentlichen nur eine Transportfunktion haben dürfte, während der eigentliche Abbau des Blutfarbstoffs andernorts stattfindet[10]. Die Menge des ausgeschiedenen Bilirubins hängt ja weitgehend vom Tempo der Zerstörung des Hämoglobins ab[11].

Die *Gallensäuren* dagegen sind ein spezifisches Produkt des Leberparenchyms[10] und haben von allen Gallebestandteilen die größte funktionelle Bedeutung für die Verdauung. Zur Bestimmung wurde zunächst die PETTENKOFERsche Reaktion verwandt und die Farbintensität im Photozellenkolorimeter gemessen. Die in der Tabelle angegebenen Zahlen zeigen den aus dem Verhältnis der Farbstärken berechneten relativen Gallensäuregehalt vor und nach Phenylmethylkarbinol. Je Volumeneinheit tritt dabei im Mittel eine Senkung um 8% auf.

In einer anderen Versuchsreihe wurde die *Oberflächenaktivität* ausgenutzt zur Schätzung der relativen Konzentration der Gallensäuren. Die Steighöhe der Galle in Kapillaren erhöhte sich nach Applikation von Phenylmethylkarbinol im Mittel um 6%.

Da das spezifische Gewicht vorher und nachher $s_1 = 1028$ und $s_2 = 1022$ betrug, die Steighöhe $h_1 = 100$ und $h_2 = 106$ war, berechnet sich der Wert für die Änderung der Oberflächenspannung nach der Formel $(s_1 . h_1) : (s_2 . h_2)$ als 100:105,3. Diese Erhöhung der Oberflächenspannung läßt auf eine Verminderung der Gallensäuren schließen. Eine Aussage über die Größe dieser Verminderung läßt sich auf Grund folgender Überlegung machen: Das Verhältnis der kapillaren Steighöhe von Wasser zu der von Galle beträgt $hw : h_1 = 100:79$, $hw : h_2 = 100:83{,}8$. Nähme man an, daß der Zusatz von Gallensäuren zu Wasser die Oberflächenspannung in einer linearen Funktion vermindert, würde man rechnen, daß die Verminderung (100—79):(100—83,8) = 21:16,2 = 100:77,2 beträgt. Das wäre eine Verminderung von 22,8%. Da die Funktion in Wirklichkeit aber nicht linear verläuft sondern hyperbolisch, darf man diesen Wert nur als grobe

Annäherung verstehen. Zusammen mit den Ergebnissen der PETTENKOFERschen Reaktion mag er aber gewertet werden.

Da also der Gallensäurengehalt der Galle nach der Applikation von Phenylmethylkarbinol um grob gerechnet 10—20% vermindert wird, kann man die Aussage machen, daß die Gesamtausscheidung an Gallensäuren durch Phenylmethylkarbinol gesteigert wird; denn die Mehrsekretion an Galle beträgt 73%.

Toxizität.

Die Giftigkeit des Phenylmethylkarbinols ist gering. Erst etwa 10 g/kg der reinen Substanz sind bei intraperitonealer Injektion für Ratten tödlich. Die Tiere kollabieren rasch und sterben nach wenigen Minuten. 5 g/kg werden ohne besondere Erscheinungen überlebt. Die Zahl der Untersuchungen für vorstehende Angaben ist klein und beträgt nur drei für jede der genannten Dosierungen. Die Angaben können somit nicht mehr als einen Anhaltspunkt für die ungefähre Höhe der tödlichen Dosis darstellen.

Aber auch im Dauerversuch wurde eine sehr geringe Giftigkeit nachgewiesen. Acht Tage lang erhielten 3 Ratten täglich 3 g/kg Phenylmethylkarbinol in 1 cm^3 Paraffinum liquidum durch die Schlundsonde. Das ist das tausendfache einer bei duodenaler Applikation noch wirksamen Dosis. Die Gewichtszunahme während dieser Zeit war bei den Versuchstieren zwar etwas geringer als bei den Kontrollen, aber das kann ausschließlich auf die Wirkung des Lösungsmittels Paraffin zurückzuführen sein. Bedeutungsvoller ist wohl die Tatsache, daß trotz der hohen Dosen von Phenylmethylkarbinol überhaupt eine Gewichtszunahme stattfand. Der gute Zustand der Versuchstiere war niemals gestört. Am 9. Tag wurden die Tiere dekapitiert und seziert.

Makroskopisch waren die inneren Organe ohne krankhaften Befund. Mikroskopisch wurden die Lebern nach Hämatoxylin-Eosin- und Fettfärbung untersucht*. Auch dabei war kein Anhalt für eine toxische Einwirkung auf die Leber feststellbar.

Die Unschädlichkeit des homologen Tolylmethylkarbinols für den Menschen wurde 1942 von KALK[12] experimentell nachgewiesen.

Einfluß des Ernährungszustandes auf die Cholerese.

Es soll nun noch ein Befund mitgeteilt werden, der zufällig erhoben wurde. Bei einer Ratte, die statt 12 Stunden versehentlich 84 Stunden ohne Futter und Wasser gewesen war, zeigte sich eine normale Gallenausscheidung, der Hunger hatte die ständige Sekretion nicht auffällig beeinflußt. Aber nach der sonst sicher wirkenden Dosis von 2 Millimol/kg Phenylmethylkarbinol und danach Tolylmethylkarbinol durch

* Für die Durchführung der Untersuchung bin ich Herrn Prof. RÖSSLE und seinem Assistenten Herrn Dr. HUMMERICH zu Dank verpflichtet.

die Schlundsonde blieb jede Sekretionssteigerung aus. Versuche, dies Ergebnis zu reproduzieren, brachten keinen ganz so krassen Befund. Doch eine Verminderung der choleretischen Wirksamkeit des Phenylmethylkarbinols bei Hungertieren war in jedem Fall unverkennbar. Nur akuter Hunger, nicht jedoch allgemeiner schlechter Ernährungszustand war für dieses Ergebnis entscheidend. Auch Durst schien nicht der wesentliche Faktor zu sein.

Aus physiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Menge der Nüchterngalle durch Hunger etwas vermindert werden kann, während Durst die Gallensekretion nicht beeinflußt[13]. In den vorliegenden Untersuchungen war jedoch die Sekretion an Nüchterngalle höchstens unwesentlich, wenn überhaupt beeinflußt, während das Versagen der Choleresesteigerung klar hervortrat.

Mit diesem Ergebnis scheint ein Faktor im Experiment gefaßt, der erzwingt, daß die erste Nahrung nach längerem Hungern vorsichtig verabreicht werden muß.

Zusammenfassung.

Die Gallensekretion der Ratte nach Verabreichung von Phenylmethylkarbinol wurde qualitativ und quantitativ untersucht.

1. Die Sekretionssteigerung betrug durchschnittlich 72%. Die vermehrt ausgeschiedene Galle war etwas wäßriger als die Normalgalle, wobei ihr Bilirubingehalt stärker vermindert war als die Konzentration an Gallensäuren. Aber auch die Ausscheidung dieser Gallebestandteile war in der Zeiteinheit vermehrt.

2. Bei duodenaler Applikation war die kleinste wirksame Dosis 3 mg/kg.

3. Die letale Dosis des Phenylmethylkarbinols für Ratten betrug intraperitoneal etwa 10 g/kg. Im Dauerversuch wurden 3 g/kg ohne Schädigung vertragen.

4. Durch akuten Hunger ließ sich der Effekt des Phenylmethylkarbinols herabsetzen.

Literatur.

[1] Koch: Münch. med. Wschr. **1927**, 972. — [2] Guttenberg: Klin. Wschr. **1926**, 1998. — Z. exper. Med. **54**, 642 (1927). — [3] Grabe: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 673 (1934). — [4] Franquelo: Münch. med. Wschr. **1933**, 24. — Robbers: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 328 (1936). — [5] Fromherz: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 571 (1942). — [6] Teeter: J. amer. med. Assoc. **131**, 1482 (1946). — [7] Aldrich and Bledsoe: J. biol. Chem. (Am.) **77**, 519 (1928). — [8] Charlet: Biochem. Z. **210**, 42 (1924). — Rosenthal: Arch. exper. Path. (D.) **157**, 165 (1930). — [9] Butenandt: Lehrbuch der physiologischen Chemie von Flaschenträger. 1942. — [10] Aschoff: Klin. Wschr. **1924**, 961. — Rosenthal: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. III, S. 1441. 1927. — [11] Babcin-Halifax: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. III, S. 778. 1927. — [12] Kalk: Dtsch. med. Wschr. **1942**, 502. — [13] Eppinger u. Elek: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. III, S. 1264. 1927.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Cholerese durch synthetische Mittel.

II. Mitteilung.

Zur vergleichenden Physiologie und Pharmakologie der Gallensekretion.

Von

WERNER KALOW.

(Eingegangen am 15. März 1948.)

Über die Cholerese bei verschiedenen Tierarten sind uns keine Arbeiten bekannt, die über den Vergleich von drei Spezies hinausgehen. Auf Grund eigener Untersuchungen mit Phenylmethylkarbinol und an Hand von Literaturangaben lassen sich jedoch allgemeine Aussagen über die vergleichende Physiologie und Pharmakologie der Gallensekretion machen.

Die Nüchternsekretion an Galle.

Ein besonders übersichtliches Ergebnis liefert der Vergleich der Galleproduktion der gebräuchlichsten Laboratoriumstiere im nüchternen Zustand. Das Ergebnis besagt, daß Karnivoren weniger Nüchterngalle sezernieren als Omni- und Herbivoren, wenn man die Untersuchungen an fünf verschiedenen Spezies so verallgemeinern darf.

Folgendes Bild bieten die Literaturangaben:

Das *Kaninchen* wurde von vielen Autoren zu Galleexperimenten verwandt, die Nüchternsekretion wurde aber besonders von STRANSKY [1] beobachtet. Er fand die Galleproduktion des Kaninchens stets reichlich und bei Rückinjektion der Fistelgalle auch sehr gleichmäßig. Daß *Meerschweinchen* und *Ratte* eine starke Nüchternsekretion haben, geht aus den Berichten von SCHOENE [2], GRABE [3] und FROMHERZ [4] hervor. *Katzen* dagegen wurden zu Galleversuchen sehr viel seltener verwandt, zweifellos weil ihre Galleproduktion im nüchternen Zustand sehr gering ist und weil sie außerdem als unregelmäßig bezeichnet worden ist [1]. ROTHLIN [5] gibt an, daß sich nur alle 1—3 Min. ein Tropfen bildet. Er gebrauchte aber trotzdem Katzen zu seinen Untersuchungen, weil er die Sekretion beim einzelnen Tier sehr gleichmäßig fand. In einer anderen Arbeit [6], in der die Choleresewirkung vegetativer Pharmaka an Katzen geprüft wurde, erhielten die Tiere zuvor Decholin, um eine Sekretion zu bekommen, die als Basis für die weiteren Versuche ausreichend und regelmäßig genug war.

Wie STRANSKY [1] darlegt, bestehen für den Hund grundsätzlich ähnliche Verhältnisse wie bei der Katze. Auch dieser habe im nüchternen Zustand nur eine ganz geringe Sekretion stark eingedickter Galle, d. h. in 15 Min. 0,1—0,35 g. Wenn bei Untersuchungen mit chronischer Gallenfistel trotzdem eine höhere Nüchternsekretion feststellbar sei, so liege das an den pathologischen Verhältnissen, die durch die Operation geschaffen sind. Er berichtet, daß sich schon

sehr bald nach dem Eingriff histologische Veränderungen in der Leber finden lassen, und daß nach längerer Dauer cirrhotische Herde mindestens mikroskopisch erkennbar werden.

Die eigenen Erfahrungen gründen sich vor allem auf Untersuchungen an Ratten, außerdem standen einige Katzen, Kaninchen und Meerschweinchen zur Verfügung. *Ratten* produzierten zwischen 5 und 15 Tropfen je 15 Min. klarer, gelber, mucinarmer Galle, durch Stunden gleichbleibend oder in nur ganz leicht abfallenden Mengen. *Meerschweinchen* sezernierten 15—25, *Kaninchen* um 40 Tropfen Galle je 15 Min. Mit den zwei Katzen dagegen hatte ich Schwierigkeiten. Bei beiden Tieren sistierte die Sekretion völlig für 1 bzw. $1^1/_4$ Stunde nach anfänglichem, kurzdauernden, reichlichen Gallenfluß, der wohl durch den Operationsreiz ausgelöst war. Dann erst setzte allmählich wieder die Galleproduktion ein, etwa in dem Ausmaß, aber nicht so regelmäßig, wie es ROTHLIN beschreibt. Immerhin ließen sich die Tiere zur Austestung eines Choleretikums verwenden. Selbstverständlich war der Ductus cysticus unterbunden, trotzdem war die Galle dunkler und schleimiger als bei der Ratte, und sie ergab auch bei der PETTENKOFERschen Reaktion einen anderen Farbton (s. I. Mitteilung, Methodik).

Die Befunde besagen also, daß Ratte, Kaninchen und Meerschweinchen nüchtern reichlich Galle produzieren, Hund und Katze dagegen nur sehr wenig. Mir scheint daher, daß die Galleausscheidung von den biologischen Differenzen in der Lebensweise der Spezies abhängt. Das Kaninchen ist ein reiner Pflanzenfresser, dessen Kost wenig variiert, und das außerdem viele Stunden des Tages mit Fressen verbringt; ähnliches gilt für das Meerschweinchen. Die physiologische Notwendigkeit, die Galleproduktion zu variieren, wird also nicht so stark sein wie bei Fleischfressern. Besonders Raubtiere können tagelang hungern, bis eine verschlungene Beute die Verdauungsdrüsen aufs höchste beansprucht. Hier müßte man eine geringe Nüchternsekretion, aber auch eine entsprechende Reaktionsfähigkeit der Leberzellen für die Galleproduktion erwarten. Bei den Allesfressern müßte man mit einer besonders feinen Anpassungsfähigkeit der Verdauungsdrüsen an die jeweils gegebene Lage rechnen.

Frühere Beobachtungen über Choleretika.

Zu dem gewonnenen Bild passen die aus der Literatur zu entnehmenden Angaben über die Wirkung von Cholereticis, obwohl die Differenzen zwischen den Tierarten von den einzelnen Autoren sehr verschieden erklärt worden sind. So hat z. B. STRANSKY[1] eine Reihe von Substanzen in ihrer Wirkung auf den Hund und das Kaninchen verglichen. Er fand dabei, daß Atophan und halogenierte Narkotika der Alkoholreihe die Gallesekretion beim Hund steigerten und beim Kaninchen hemmten. Da es sich bei diesen Mitteln um prinzipiell

leberschädigende Substanzen handelt, stellte er als verallgemeinernden Lehrsatz die Behauptung auf, daß die Hundeleber weniger empfindlich gegen Parenchymgifte sei und in Konzentrationen, die die Leberzelltätigkeit des Kaninchens bereits hemmen, erst zu erhöhter Produktion gereizt werde. Er forderte deshalb, daß in Zukunft nur noch Kaninchen zur Prüfung choleretisch wirkender Substanzen herangezogen werden sollten. STRANSKY fand nun aber auch, daß das Papaverin, also eine Substanz, die nicht als lebertoxisch bekannt ist, beim Hund galletreibend wirkt, beim Kaninchen jedoch nicht. Schon damit wird die Allgemeingültigkeit seines Lehrsatzes etwas fraglich.

FROMHERZ [4] verglich verschiedene Substanzen bei der Ratte und dem Kaninchen und fand, daß die Ratte auf sehr verschiedenartige Körper mit Cholerese ansprach, die beim Kaninchen unwirksam blieben. Da dieser Tatbestand auch für das Papaverin zutraf, erörterte es eine ganz andere Theorie: die Ratte habe keine Gallenblase, infolgedessen sei zu erwarten, daß das ganze Gangsystem deren Funktion übernehme. Bei den Untersuchungen am Kaninchen wird der Ductus cysticus unterbunden und damit der Gallenspeicher ausgeschaltet. Vielleicht bewirke nun Papaverin nur eine Spasmolyse im Gallengangsystem der Ratte und damit eine Ausscheidung gespeicherter Galle, während durch die Cysticusunterbindung beim Kaninchen ein analoger Vorgang unmöglich sei. Es glückte FROMHERZ jedoch nicht, die zu einer solchen Funktion notwendige Muskulatur im Gallengangsystem der Ratte aufzufinden.

Faßt man diese und weitere Angaben zusammen, so zeigt sich, daß das Kaninchen auf eine ganze Reihe von Choleretics nicht reagiert, die bei anderen Spezies wirken. So spricht es z. B. im Vergleich zu Ratte und Katze nicht auf Cholsäure und Taurocholsäure an [4, 5]. Weitere Stoffe, die bei der Ratte wirken und beim Kaninchen nicht, sind Papaverin, Tropasäureamide, Trasentin* und Syntropan** [4]. Gegenüber dem Hund reagiert es nicht auf Morphin, Papaverin, Chinin, Benzoesäure, Salizylsäure, Atophan, halogenierte Alkohole, ätherische Öle in größeren Gaben [1] und Jodsalizylsäure [7]. Diese Reihe umfaßt also körpereigene Stoffe wie einige Gallensäuren, verschiedene Pharmaka und Alkaloide sowie ausgesprochen leberschädigende Substanzen. Umgekehrt ist mir kein Stoff bekannt, der die Kaninchencholerese förderte und bei anderen Tieren versagte. Leider liegen keine entsprechenden Vergleichsuntersuchungen für weitere Tierspezies vor.

Cholerese durch Tolyl- und Phenyl-methylkarbinol.

Bei fünf verschiedenen Tierarten und außerdem beim Menschen wurden Tolyl- und Phenyl-methylkarbinol oder wenigstens eines dieser homologen Choleretika geprüft. Faßt man die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen und die Angaben aus der Literatur für jede Spezies zusammen, so wird das aus dem bisherigen Material gewonnene Bild erweitert.

* Diphenylazetyl-diäthylaminoäthanolester HCl.
** Phosphorsaurer Diäthylamino-dimethylpropanolester der Tropasäure.

Am umfassendsten sind die Experimente an der *Ratte*. GRABE [3] wies als erster nach, daß der choleretische Effekt der Kurkumadroge auf ihren Bestandteil p-Tolylmethylkarbinol zurückzuführen ist. SCHOENE [2] kontrollierte und bestätigte seine Untersuchungen mit dem Campher- und Phthalsäureester des Tolylmethylkarbinols an der Ratte. FROMHERZ [4] prüfte zuerst das Phenylmethylkarbinol und brachte die Verallgemeinerung, daß Arylalkylkarbinole choleretisch wirkten. Bei der eigenen Arbeit wurde mehr Wert auf die Feststellung der Gallequalität nach Phenylmethylkarbinol gelegt; die näheren Angaben dazu finden sich in der I. Mitteilung dieser Arbeit.

Für das *Kaninchen* wurde die Unwirksamkeit der beiden Homologen auch bereits früher festgestellt. KALK und NISSEN [8] wiesen die Wirkungslosigkeit des Kurkumaextraktes nach. FROMHERZ wurde durch den mangelnden Effekt des Phenylmethylkarbinols zu seiner oben geschilderten Theorie angeregt. Es schien also nicht notwendig, diese Versuche in größerem Maßstab zu wiederholen.

Tabelle 1.

	p-Tolylmethylkarbinol	Phenylmethylkarbinol
Mensch	+ 8, 10	
Ratte	+ 2, 3, *	+ 4, *
Meerschweinchen	+ 2, *	+ *
Kaninchen	— 4, 8	— 4, *
Katze		+ *
Hund	+ 2, 8, 9	

\+ bedeutet das Eintreten einer Gallensekretionssteigerung bei der betreffenden Spezies, das Ausbleiben eines solchen Effektes. Die Ziffern sind Literaturangaben, * Originaluntersuchungen.

Zwei eigene Experimente mit 0,24 g/kg Phenylmethylkarbinol bestätigten die Wirkungslosigkeit beim Kaninchen.

Man könnte nun erwarten, daß das *Meerschweinchen* auch gar nicht auf diese Choleretika reagiert. Aber das ist nicht der Fall. Es ist ja auch nicht gesagt, daß alle Herbivoren völlig gleich reagieren müssen. SCHOENE hat jedenfalls für Tolylmethylkarbinolester die Steigerung der Gallensekretion beim Meerschweinchen eindeutig nachgewiesen. Für die eigenen Untersuchungen mit Phenylmethylkarbinol standen mit vier dieser Tiere zur Verfügung. Bei diesem kleinen Versuchsmaterial war das Ergebnis allerdings nicht so klar. Bei zwei von vier Meerschweinchenversuchen sah ich Versager, während dies bei 32 Rattenversuchen nur einmal auftrat. Bei 2 Meerschweinchen steigerte sich die Anzahl der Galletropfen nach 0,245 g je Kilogramm Phenylmethylkarbinol von 23 auf 39 bzw. von 19 auf 36 Tropfen je 15 Min. Tolylmethylkarbinol erzeugte bei einem Meerschweinchen eine Sekretionssteigerung von 22 auf 31 Tropfen je 15 Min. Es ist also sicher, daß sich Meerschweinchen diesen Mitteln gegenüber nicht so reaktionslos verhalten wie Kaninchen, andererseits scheinen sie doch häufiger als Ratten refraktär gegen Phenylmethylkarbinol zu sein.

Über die Wirkung bei *Katzen* lag keine Literatur vor. Zwei eigene Versuche zeigten hinsichtlich der Cholerese positive Ergebnisse.

Die Tropfenzahl stieg nach 0,24 g/kg Phenylmethylkarbinol von 8 auf 15 bzw. von 14 auf 30 Tropfen je Viertelstunde. Man darf also auch die Katze zu den Spezies zählen, bei denen Phenylmethylkarbinol eine Steigerung der Cholerese hervorruft.

Am *Hund* ist die Wirksamkeit des Tolylmethylkarbinols durch Angaben in der Literatur belegt.

Kalk und Nissen[8] untersuchten den Kurkumaextrakt, Robbers[9] das Tolylmethylkarbinol, und Schoene die bereits erwähnten Ester des Tolylmethylkarbinols. Eigene Experimente liegen nicht vor.

Abschließend seien die entsprechenden Versuche am *Menschen* aufgezählt: Kalk und Nissen wiesen die Choleresewirkung des Kurkumaextraktes und damit des natürlichen Tolylmethylkarbinols bei Gesunden und Kranken nach. Die Wirksamkeit des synthetischen Tolylmethylkarbinols in Form seines Camphersäureesters wurde von Siebert, Kalk und Brühl[10] festgestellt.

Zusammengefaßt bringt nun die Tabelle noch einmal die Ergebnisse. Das Ausmaß der Sekretionssteigerung ist nicht verzeichnet, sondern nur die Angabe, bei welchen Spezies Tolylmethylkarbinol und Phenylmethylkarbinol einen choleretischen Effekt haben.

Diskussion.

Der Gebrauch eines ungeeigneten Versuchstieres kann bei allen biologischen Experimenten leicht zu falschen Schlußfolgerungen für die Therapie beim Menschen führen. Es ist also gut, wenn man klare Gesichtspunkte für die Auswahl seiner Objekte hat. Will man mit Hilfe der Laboratoriumstiere choleretisch wirksame Substanzen in Beziehung zur ärztlichen Therapie bringen, so scheint es, als ob die Allesfresser, in unserem Falle die Ratten dafür am besten geeignet seien, obwohl ihre ableitenden Gallenwege anders gebaut sind als bei der Mehrzahl der Säuger und beim Menschen.

Gegen Stranskys warnende Forderung, nur Kaninchen zu Galleversuchen zu verwenden, lassen sich verschiedene Einwände machen. Im Tolylmethylkarbinol und seinen Homologen sind Substanzen gefunden, die beim Kaninchen keine Cholerese hervorrufen, die jedoch bei anderen Tieren und auch beim Menschen wirken, und die doch offensichtlich nicht giftig sind. Jedenfalls wurde im klinischen Laboratorium von Kalk[10] das Tolylmethylkarbinol ungiftig befunden; vom Phenylmethylkarbinol ist die letale Dosis an der Ratte mehrtausendfach höher als die minimale wirksame Gabe (s. I. Mitteilung). Vielleicht ist es ein noch stärkeres Argument, daß es sogar Gallensäuren gibt, die die Cholerese beim Kaninchen unbeeinflußt lassen, jedoch bei anderen Tieren choleretisch wirken. Im gleichen Sinne berichtigen

— wie erwähnt — noch die Eigenschaften weiterer Substanzen Stransкys Empfehlung des Kaninchens als Versuchstier.

Die Gründe für die verschiedenartige Ansprechbarkeit der einzelnen Spezies auf Choleretika mögen vielfacher Art sein. Die wichtigste Ursache mag in feinsten biochemischen Differenzen im Stoffwechsel der Tierarten liegen. Aufklärung hierüber zu geben, bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

Zusammenfassung.

1. Fleischfresser sezernieren im nüchternen Zustand sehr wenig Galle, Herbi- und Omnivoren dagegen reichlich.

2. Die Galleproduktion des Kaninchens wird durch eine große Anzahl verschiedenartigster Substanzen nicht beeinflußt, die bei anderen Tieren choleretisch wirken.

3. Mensch, Ratte, Katze und Hund reagieren auf Tolylmethylkarbinol oder Phenylmethylkarbinol mit Cholerese; das Kaninchen dagegen ist refraktär. Beim Meerschweinchen trat der Effekt von Phenylmethylkarbinol nicht regelmäßig ein.

4. Folgerungen für die Wahl von Versuchstieren zu Galleuntersuchungen, Möglichkeiten und Grenzen von Rückschlüssen für die Therapie werden erörtert.

Literatur.

[1] Stransky: Z. exper. Med. **66**, 73 (1929). — [2] Schoene: Arch. exper. Path. (D.) **190**, 372 (1938). — [3] Grabe: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 673 (1934). — [4] Fromherz: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 571 (1942). — [5] Rothlin u. Schalch: Helvet. physiol. Acta **2**, 249 (1944). — [6] Flexner and Wright: J. Pharm. a. exper. Ther. **66**, 171 (1939). — [7] Kauftheil u. Rappaport: Klin. Wschr. **1932**, 810. — [8] Kalk u. Nissen: Dtsch. med. Wschr. **1931**, 1613; **1932**, 1718. — [9] Robbers: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 328 (1936). — [10] Siebert: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 679; Kalk: Dtsch. med. Wschr. **1942**, 502; Brühl: Dtsch. med. Wschr. **1943**, 108.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

Karotissinusentlastung und Nebennieren.

Arterenol chemischer Überträgerstoff sympathischer Nervenerregungen und Hormon des Nebennierenmarks*.

Von

Peter Holtz und Hans-Joachim Schümann.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. März 1948.)

Der Karotissinusnerv — der „Nerv von H. E. Hering", wie er in der belgisch-französischen Literatur heißt — übt eine vagal-tonische Hemmung auf Herz und Gefäße aus, da seine Reizschwelle durch den normalen Druck der auf den Sinuswandungen lastenden Blutsäule dauernd überschritten wird. Dieser vagale Hemmungstonus bedeutet *humoral-chemisch* Dauersekretion von Azetylcholin an den parasympathischen Nervenendigungen in Herz- und Gefäßmuskulatur. Ein Absinken des Drucks im Sinusgebiet, eine Druckentlastung der Sinuswandungen muß den vagalen Dauertonus herabsetzen und die vom Reflexzentrum entsandten Impulse verringern, was humoral-chemisch mit einer verminderten Azetylcholinproduktion an den Endigungen der zentrifugalen parasympathischen Nerven des Herzens und der Gefäße gleichbedeutend wäre. Es ist wahrscheinlich, daß der vagale Tonusverlust, wenigstens wenn er höhere Grade erreicht, mit einer Tonisierung sympathischer vasomotorischer Zentren gekoppelt ist, so daß der *verminderten* Azetylcholinproduktion eine *erhöhte* Produktion von Sympathikusstoff entspräche. Das dürfte der Fall sein bei der Herzbeschleunigung und dem Blutdruckanstieg, die man bei einer Karotissinusentlastung durch Abklemmen der Karotiden beobachtet.

Beide Regulatoren der Tonuslage vegetativ innervierter Systeme, *Sympathikus-* und *Parasympathikusstoff*, sind labile Substanzen, durch Blut- und Organfermente leicht angreifbar. Sie verursachen deshalb, zumal sie zur Ausübung ihrer regulatorischen Funktion nur in geringer Menge gebildet werden, im allgemeinen lediglich örtlich begrenzte, keine Fernwirkungen. Im Gegensatz zum Parasympathikusstoff gibt es aber für den Sympathikusstoff die Möglichkeit einer gewaltigen

* Über einen Teil der Ergebnisse wurde in der Dissertation H. J. Schümann, Rostock, April 1945 berichtet.

Vergrößerung seines „Aktionsradius“: durch Ausschüttung aus den *Nebennieren*, den Bildungsstätten und Depotorganen für „Sympathin“. Nach unseren vor allem auf den Untersuchungen Cannons fußenden Vorstellungen macht der Organismus von dieser Möglichkeit Gebrauch, wenn außergewöhnliche Anforderungen an ihn gestellt werden, daher ihre Kennzeichnung als „*Notfallsfunktion*“. Eine solche im Falle der Not erfolgende Ausschüttung wirksamer Substanz in die Blutbahn müßte dann den engen Rahmen örtlich begrenzter, regulatorischer Wirkungen der an sympathischen Nervenendigungen freiwerdenden kleinen Sympathinmengen sprengen und Allgemein- und Fernwirkungen auslösen, bei denen eine Verschiebung der Gleichgewichtslage des gesamten autonomen Systems im Sinne eines generell erhöhten Sympathikustonus zu erwarten wäre.

Nach C. Heymans[1] übt die im Karotissinus gelegene pressosensible Regulationsstelle nicht nur einen vagalen Hemmungstonus für das Herz und einen „tonus vasodepresseur“ aus, sondern auch einen „tonus inhibiteur de l'adrénalino-sécrétion“. Druckabnahme im Sinusgebiet müßte dann also mit einer *vermehrten Adrenalinsekretion* durch die Nebenniere verbunden sein, „Karotissinusentlastung“ durch brüske Abklemmung der Karotiden eine Ausschüttung von Adrenalin veranlassen und zu einer sympathicotonischen Umstellung im Organismus führen.

Es liegen Befunde vor, die für eine solche Einbeziehung der Nebennieren in den Mechanismus der vom Karotissinus ausgehenden Regulationen sprechen, vor allem die von Heymans sebst gemachte Beobachtung, daß es in Versuchen an Hunden, deren Gefäßsystem durch eine Anastomose zwischen V. suprarenalis des „Spenders“ und V. jugularis des „Empfängers“ miteinander kommunizierte, zu einer *Milzkontraktion* des Empfängertieres kommt, wenn beim Spendertier durch Karotidenabklemmung eine Karotissinusentlastung vorgenommen wird. Demgegenüber sind negative Untersuchungsergebnisse anderer Autoren, z. B. diejenigen P. Thelens[2], F. Brauchs[3] und U. S. v. Eulers[4], über die Beeinflussung des *Blutzuckerspiegels* durch Karotissinusentlastung nur schwer vereinbar mit der Annahme einer Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren im Gefolge der Karotissinusentlastung.

1. Karotissinusentlastung, Blutzuckerspiegel und Blutdruck.

Methodik. Die Versuche wurden an Katzen in Pernoctonnarkose gemacht: 0,8 cm³/kg i.m. der 10%igen Lösung „ad usum veterinarium“. Die *Blutdruck-*

[1] Heymans, C. u. P. Regniers: Arch. internat. Pharmacodynam. **36**, 116 (1929). — Klin. Wschr. **1930**, 673. — [2] Thelen, P.: Z. exper. Med. **86**, 231 (1933). [3] Brauch, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **175**, 104 (1934). — [4] Euler, U. S. v.: Skand. Arch. Physiol. (D.) 71, 73 (1935).

BOSTON

registrierung erfolgte unter Benutzung der TRENDELENBURGschen Gegenstromapparatur zur Verhinderung der Blutgerinnung aus der A. femoralis. Die Adrenalinlösung wurde in die V. jugularis infudiert. — Der *Blutzucker* wurde nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt. — Zum *Adrenalinnachweis* im Blut diente die THUNBERGsche Methylenblaumethode nach den Angaben von AHLGREN[5] und v. EULER[5a]: zu 200 mg mit der Schere zerkleinerter Froschmuskulatur, die sich in einem THUNBERG-Röhrchen befindet, werden 0,2 cm³ des zu untersuchenden Serums, sowie 0,8 cm³ Methylenblau-Puffergemisch gegeben (8,0 cm³ Methylenblau 1:500 + 6,0 cm³ m/10 KH_2PO_4 + 2,0 cm³ Aqua dest.). Die Versuchsröhrchen werden dann evakuiert und in einen Wasserthermostaten von 35° C gebracht.

In Übereinstimmung mit den von THELEN, BRAUCH und v. EULER an Kaninchen und Hunden erhaltenen Ergebnissen blieb die Karotissinusentlastung auch in unseren Versuchen an Katzen ohne jeden Einfluß auf den *Blutzuckerspiegel*, obwohl sie eine ausgeprägte *Blutdruck*reaktion hervorrief. Die einfachste Erklärung wäre, daß der ausgeübte Reiz nicht ausreicht, um Mobilisierung von Glykogen und Hyperglykämie zu veranlassen. Demgegenüber ist aber zu berücksichtigen, daß nach den Untersuchungen v. EULERS[4] der Adrenalingehalt des Blutes bei Abklemmung der Karotiden auf Werte ansteigt, die mitunter 30fach höher liegen als die normalen und genügen müßten, um eine hyperglykämische Reaktion auszulösen. — In den v. EULERschen Versuchen wurden die Adrenalinbestimmungen mit der THUNBERGschen Methylenblaumethode gemacht. Adrenalin verursacht innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs in dem System „Froschmuskulatur-Methylenblau" eine von der Konzentration abhängige Beschleunigung der Entfärbung. In eigenen Versuchen konnten wir uns davon überzeugen, daß während einer Karotissinusentlastung der Versuchskatze entnommenes Blut bzw. Serum die Entfärbungszeit deutlich verkürzte. Diese Wirkung ist aber nicht spezifisch für Adrenalin.

Während *intravenöser Adrenalininfusionen* gleicher Dauer und *gleicher pressorischer* Wirkung wie die Karotissinusentlastung kam es regelmäßig zu deutlichen Blutzuckeranstiegen, in einem Versuch z. B. von 110 auf 195 mg-%. Nun ist die während einer Druckentlastung des Sinusgebietes auftretende *Blutdrucksteigerung* sicher nicht allein durch eine Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren bedingt. Denn auch nach Exstirpation beider Nebennieren hat die Karotissinusentlastung noch einen deutlichen Blutdruckeffekt (s. Abb. 9). Die durch Karotissinusentlastung ausgelöste Steigerung des Blutdrucks muß deshalb, wie schon in der Einleitung dargelegt wurde, zu einem wesentlichen Anteil auf einem mit vagalem Tonusverlust gekoppelten und durch ihn verursachten vermehrten Freiwerden von „Sympathin" an den

[5] AHLGREN, G.: In ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. IV, Teil 1, S. 671. 1926. — [5a] EULER, U. S. v.: Pflügers Arch. 217, 699 (1927).

sympathischen Nervenendigungen des Herzens und der Gefäße beruhen. Aber weder der von den Nebennieren abgegebene, noch der an den sympathischen Nervenendigungen der Gefäße als „Sympathin" freiwerdende Anteil blutdrucksteigernder Substanz kann *Adrenalin* sein. Das geht aus der verschiedenen Beeinflußbarkeit der nach Adrenalin bzw. der nach Karotissinusentlastung auftretenden Blutdrucksteigerung durch *Ergotoxin* oder *Yohimbin* hervor: Vorbehandlung mit einem der beiden Alkaloide führt beim *Adrenalin* zu einer glatten Umkehr der blutdruck*steigernden* in eine blutdruck*senkende* Wirkung; die durch

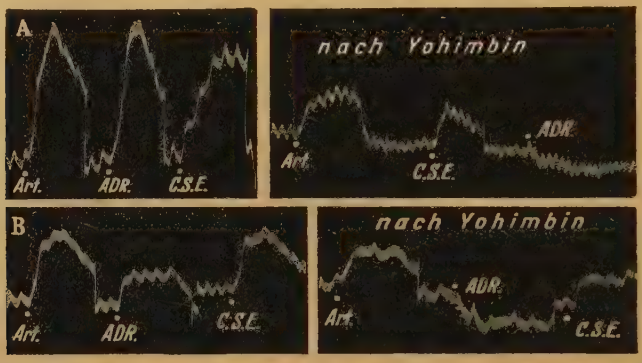


Abb. 1. Einfluß von Yohimbin auf die durch Karotissinusentlastung verursachte Blutdrucksteigerung. A. Katze, 2,4 kg, Pernoktonnarkose. *C.S.E.* Karotissinusentlastung (Abklemmung beider Karotiden); *ADR.* 5 γ Adrenalin; *Art.* 4 γ Arterenol (6 mg/kg Yohimbin intramuskulär). B. Katze, 2,8 kg, Pernoktonnarkose. ADR. 2,5 γ Adrenalin; *Art.* 2,5 γ Arterenol. Die Blutdruckwirkung des Adrenalins wird durch Yohimbin umgekehrt, diejenige des Arterenols und der *C.S.E.* nur abgeschwächt.

Karotissinusentlastung verursachte pressorische Wirkung erfährt hingegen nur eine Abschwächung und verhält sich damit, wie die Abb. 1 an zwei Beispielen zeigt, wie die Blutdruckwirkung des *Arterenols-Noradrenalins*, die ebenfalls im Gegensatz zur Adrenalinwirkung durch Yohimbin nicht umgekehrt, sondern nur abgeschwächt wird. Die humorale bzw. hormonale Übertragung der mit der Karotissinusentlastung verbundenen sympathischen Erregungen durch Arterenol stände nicht nur im Einklang mit dem Verhalten des Blutdruckanstiegs gegenüber Yohimbin, sie würde auch das Ausbleiben einer hyperglykämischen Reaktion während der Karotissinusentlastung verständlich machen. Denn Arterenol ist, wie aus anschließend veröffentlichten, vergleichend pharmakologischen Untersuchungen von H. J. Schümann[6] über Adrenalin und adrenalinverwandte Stoffe hervorgeht, ungefähr 20 mal weniger hyperglykämisch wirksam als Adrenalin. — Die

[6] Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**.

folgenden Versuche liefern weitere Stützen für die Auffassung des Arterenols als chemischen Überträgerstoffs sympathischer Nervenerregungen und Hormons der Nebennieren.

2. Karotissinusentlastung und Darm.

Der *Darm* ist eines der empfindlichsten Testobjekte zum Nachweis von *Adrenalin*. In neueren Versuchen am isolierten Darm verschiedener Tierarten beobachtete ACHUTIN[7] Hemmungswirkungen noch bei Adrenalinkonzentrationen von 1/800 Mill. Als besonders empfindlich gegenüber der hemmenden Adrenalinwirkung erwies sich der Katzendarm; er reagierte empfindlicher als beispielsweise Kaninchendarm.

Methodik. Unsere Versuche über die Beeinflussung der Darmbewegungen durch Karotissinusentlastung wurden an *Katzen* in Pernoctonnarkose und an *Hunden* in Chloralosenarkose gemacht. Die Darmmotorik registrierten wir nach der von STRAUB[8] angegebenen Methode: nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde eine Glaskanüle in eine abgebundene ungefähr 10 cm lange Darmschlinge eingebunden, wobei darauf zu achten ist, daß die Kanüle cranialwärts eingeführt wird. Sie ist durch einen mit körperwarmer Tyrodelösung gefüllten Gummischlauch mit einem Wassermanometer verbunden, dessen durch die Darmperistaltik verursachte Schwankungen auf der berußten Trommel gleichzeitig mit der Blutdruckkurve aufgezeichnet werden. Einzelheiten bezüglich Herstellung des erforderlichen Innendrucks usw. s. bei STRAUB.

Abb. 2. Karotissinusentlastung ohne Einfluß auf Darmmotorik. Arterenol verursacht weit schwächere Darmlähmung als Adrenalin. Katze, 2 kg, Pernoctonnarkose. *C.S.E.* Karotissinusentlastung; *ADR.* 2,5 γ Adrenalin; *Art.* 2,5 γ Arterenol.

Wenn nach Karotissinusentlastung eine im Sinne HEYMANS erhöhte *Adrenalinsekretion* durch die Nebenniere zwar nicht genügte, um den *Blutzucker* ansteigen zu lassen, offenbar aber wohl dazu ausreichte, um in Versuchen an Hunden mit einer „anastomose veneuse surrénalo-jugulaire" sogar beim „Empfängertier" eine *Milzkontraktion* zu veranlassen, so durfte vielleicht erwartet werden, daß es an der Katze, die bei unserer Versuchsanordnung zugleich Adrenalin*spender* und *-empfänger* sein würde, nach Karotissinusentlastung zu einer *Darmhemmung* komme. In zahlreichen Versuchen zeigte sich, daß diese Erwartung

[7] ACHUTIN, M. N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **171**, 668 (1933). — [8] STRAUB, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 1 (1933).

nicht zutrifft. Wir haben mit Ausnahme des in der Abb. 7 dargestellten Versuchs, in dem die Karotissinusentlastung eine leichte Hemmung der Darmbewegungen zu verursachen scheint, nie auch nur die geringste Andeutung einer Darmhemmung nach Karotidenabklemmung gesehen. Die Abb. 2 und 3 geben Beispiele für das negative Ergebnis dieser Untersuchungen. Daneben zeigen sie, daß die intravenöse Injektion einiger Gamma *Adrenalin* eine starke Lähmung unter Tonusabfall und mit Sistieren der Bewegungen hervorruft. Demgegenüber hat die gleiche Dosis Arterenol, die, wie die gleichzeitig registrierten Blutdruckkurven zeigen, am *Blutdruck* mit Adrenalin mindestens gleichwirksam ist, eine weit schwächere *Darmwirkung*. — Das gleiche Ergebnis hatten entsprechende Versuche an Hunden (Abb. 4).

Abb. 3. Karotissinusentlastung und Darm. Katze, 2,8 kg. *C.S.E.* Karotissinusentlastung; *ADR.* 5 γ Adrenalin; *Art.* 5 γ Arterenol.

Somit würden die Ergebnisse auch dieser Versuche eher für eine im Gefolge der Karotissinusentlastung auftretende Ausschüttung nur wenig darmwirksamen Arterenols als für eine solche von Adrenalin sprechen, das schon in kleinen Mengen starke Darmhemmungen verursacht.

3. Karotissinusentlastung und Milz.

a) Das nach Heymans im Anschluß an eine Karotissinusentlastung aus den Nebennieren ausgeworfene Adrenalin reicht nicht aus, um in den Untersuchungen von Thelen, Brauch und von v. Euler, sowie in unseren eigenen Versuchen den *Blutzuckerspiegel* zu erhöhen, es vermag auch nicht die in unseren Versuchen an Katzen und Hunden in situ registrierten *Darmbewegungen* zu lähmen, es veranlaßt jedoch in den Heymansschen Versuchen an anastomosierten Hunden sogar im „Empfängertier" eine *Milzkontraktion*. Die Milz müßte also empfindlicher auf Adrenalin reagieren als der Darm. Wir haben Versuche unter gleichzeitiger Registrierung der Darmbewegungen und des Milzvolumens gemacht.

Methodik: Die Versuchskatzen waren mit Pernocton narkotisiert. Das Milzvolumen wurde mit einem zylinderförmigen, selbst hergestellten Onkometer aus Glas registriert, das durch einen dünnen Gummischlauch mit einer MAREYschen Kapsel verbunden war.

Die Abb. 5 zeigt, daß es tatsächlich während der Karotissinusentlastung zu einer deutlichen Volumabnahme der *Milz* kommt, während der *Darm* unbeeinflußt bleibt. Die Wirkung der Karotissinusentlastung muß deshalb durch eine Substanz vermittelt sein, die schon in einer Konzentration, welche für den Darm unwirksam ist, eine Milzkontraktion verursacht. Diese Substanz kann jedoch nicht Adrenalin sein. Denn die Adrenalinmenge, welche eine gleichstarke *Milzkontraktion* wie die Karotissinusentlastung verursacht, übt im Gegensatz zur Karotissinusentlastung auch eine starke *Darmhemmung* aus (Abb. 5). Auch in Dosierungen, die deutlich weniger milzwirksam sind als die Karotissinusentlastung, veranlaßt Adrenalin noch eine Darmhemmung (Abb. 6).

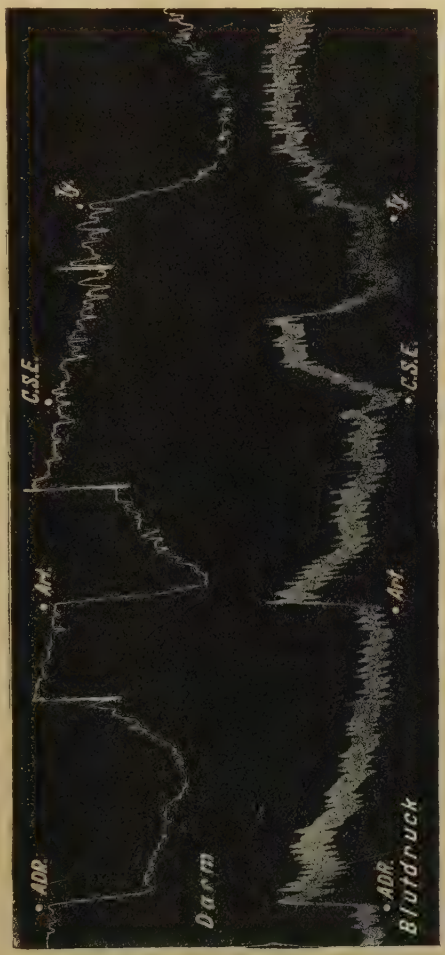


Abb. 4. Karotissinusentlastung und Darm. Hund, 8 kg, Chloralosenarkose. *ADR.* 20 γ Adrenalin; *Art.* 20 γ Arterenol; *C.S.E.* Karotissinusentlastung; *Ty.* 1 mg Tyramin.

Arterenol hingegen mit seiner nur schwach ausgebildeten *inhibitorischen* bei voll ausgeprägter *„excitatorischer"*, blutdrucksteigernder und gefäßkonstriktorischer Wirkung läßt in Dosierungen, welche die *Milz* zu deutlicher Kontraktion bringen, den *Darm* praktisch unbeeinflußt und imitiert damit auf das Vollkommenste den Effekt einer Karotissinusentlastung (Abb. 7 und 8). — Diese Befunde sind, wie wir glauben, beweisend dafür, daß die durch Karotissinusentlastung aus den Nebennieren ausgeworfene milz*wirksame,* aber blutzucker- und

darm*unwirksame* Substanz nicht *Adrenalin* sein kann; sie sprechen für ihre Identität mit *Arterenol.*

Man könnte folgenden Einwand machen: die wirksame Substanz, die in den HEYMANSschen Versuchen mit anastomosierten *Hunden* die Milz des „Empfängers" zur Kontraktion bringt, wenn beim „Spender" eine Karotissinusentlastung vorgenommen wird, entstamme zwar wohl ausschließlich der *Nebenniere;* in unseren Versuchen mit *Katzen,* in denen sich die Milz am gleichen Tier kontrahiert, an dem die Karotissinusentlastung vorgenommen wird, komme jedoch noch eine zweite Quelle für den chemischen Überträgerstoff in Frage, nämlich die *sympathischen Nervenendigungen* in den Wandungen der Milzgefäße und Milzsinus. Es sei ja nur sinngemäß und zweckentsprechend, wenn ein Organ wie die Milz, das als Blutspeicher hämodynamisch und blutchemisch wichtige Kreislauffunktionen auszuüben habe, in den vom Karotissinus aus steuerbaren und auslösbaren, nervös-humoralen Reflexmechanismus direkt miteinbezogen sei, derart, daß ähnlich wie die im Gefolge einer Karotissinusentlastung auftretende *allgemeine Blutdrucksteigerung* wenigstens zum Teil durch ein vermehrtes Freiwerden von Sympathikusstoff in den Wandungen der *Körpergefäße,* so die *Kontraktion der Milz* überwiegend durch eine erhöhte Sekretion von Sympathin im *Gefäßbereich der Milz* verursacht sei. Damit wäre dann aber die *Milz* dem *Darm* gegenüber sozusagen „im Vorteil", indem für eine Beeinflussung der glatten Muskulatur des Darmes ja nur die Nebennieren als einzige Quelle des nach Karotissinusentlastung zur Ausschüttung gelangenden „Sympathins" in Frage kämen. Es fände dann aber das verschiedene Verhalten von Darm und Milz bei Karotissinusentlastung eine zwanglose Erklärung auch für den Fall, daß der von den Nebennieren und von den sympathischen Nervenendigungen sezernierte Sympathikusstoff mit *Adrenalin* identisch wäre. Die nach einer Karotissinusentlastung von den *Nebennieren*

Abb. 5. Karotissinusentlastung und Adrenalin: Wirkung auf Milz und Darm. C.S.E. läßt trotz starker Milzkontraktion den Darm unbeeinflußt; Adrenalin verursacht auch Darmhemmung. Katze, 3,6 kg, Pernoctonnarkose. *C.S.E.* Karotissinusentlastung *ADR.* 2 γ Adrenalin.

abgegebene Adrenalinmenge würde eben nur in der *Milz*, nicht aber im Darm durch eine zusätzliche, *örtliche* Adrenalinsekretion zur wirksamen Dosis komplettiert.

b) Es war deshalb von entscheidender Bedeutung, die Versuche *nach Ausschaltung der Nebennieren* zu wiederholen. Diese erfolgte

Abb. 6. Beeinflussung von Milzvolumen und Darmmotorik durch Karotissinusentlastung (C.S.E.) und Adrenalin (1 γ und 0,5 γ). Katze, 3,2 kg, Pernoctonnarkose. *C.S.E.* wie in Abb. 5 trotz starker Milzwirkung ohne Darmwirkung. Demgegenüber verursacht auch die kleinere Adrenalindosis (0,5 γ) bei weit schwächerer Milzwirkung eine deutliche Darmhemmung.

meistens durch Exstirpation der linken und durch Abbinden der rechten Nebenniere, die bei der Katze fast immer mit benachbarten Venen so innig verwachsen ist, daß eine restlose Entfernung ohne Blutung schwierig ist.

Die Abb. 9 zeigt das prinzipiell verschiedene Verhalten von „Milz" und „Blutdruck". Die durch Karotissinusentlastung verursachte *Blutdrucksteigerung* wird auch nach Ausschaltung beider Nebennieren, wenn auch in abgeschwächtem Maße erhalten, die *Kontraktion der Milz*

bleibt jedoch jetzt vollkommen aus. Daß die Milz andererseits noch reaktionsfähig ist, und die Registrierung durch das Onkometer, das während der Nebennierenexstirpation abgenommen und später wieder neu angelegt werden mußte, mit genügender Empfindlichkeit erfolgt, wird durch die starke Wirkung belegt, welche die intravenöse Injektion von 0,5 γ Adrenalin hat. Die Milz ist demnach nicht in den nervös-humoralen Mechanismus einbezogen, der den durch Karotissinusentlastung ausgelösten Kreislaufreflexen zugrunde liegt. Derselbe Reiz — die Karotissinusentlastung —, der in den *Körpergefäßen* an den sympathischen Nervenendigungen „Sympathin" freiwerden und dadurch den allgemeinen Blutdruck ansteigen läßt, tut das im Bereich der *Milz* offenbar *nicht*. Die im Gefolge einer Karotissinusentlastung auftretende Milzkontraktion ist nicht wie die gleichzeitig erfolgende Blutdruckerhöhung schlechthin *„humoral"* bedingt, sondern vielmehr *„hormonal"*: durch innere Sekretion der wirksamen Substanz aus den Nebennieren. Damit befindet sich dann aber die Milz nicht mehr „im Vorteil" gegenüber dem Darm, indem für beide Organe die Nebennieren *alleinige* Quelle für das bei Karotissinusentlastung zur Wirkung gelangende „Sympathin" sind, und es besteht zu Recht, was weiter oben aus den Versuchen mit gleichzeitiger Registrierung von Milzvolumen und Darmbewegungen gefolgert wurde: *Das bei Karotissinusentlastung aus den Nebennieren sezernierte „Sympathin" kann nicht Adrenalin sein, da eine Adrenalinmenge, welche eine so starke Volumverminderung der Milz veranlaßt wie sie nach Karotissinusentlastung auftritt, auch eine deutliche Darmhemmung hervorrufen würde. Der Darm bleibt aber bei Karotissinusentlastung nahezu vollkommen unbeeinflußt. Alles spricht dafür, daß Arterenol und nicht Adrenalin auf den Reiz der Karotissinusentlastung hin als Sympathikusstoff aus den Nebennieren zur Ausschüttung gelangt.*

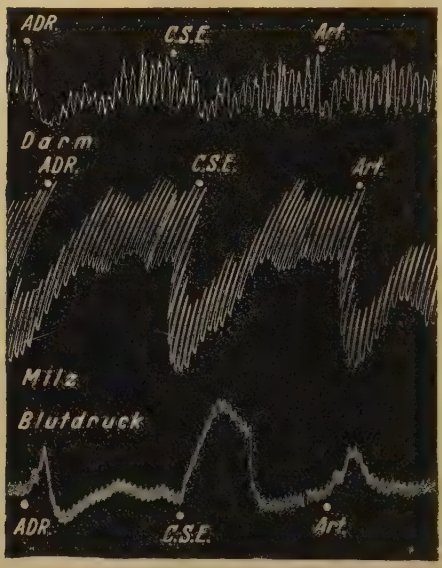


Abb. 7. Die bei Karotissinusentlastung aus den Nebennieren ausgeschüttete Substanz kann nicht Adrenalin sein. Sie könnte Arterenol sein. *ADR.* 0,5 γ Adrenalin: Milzkontraktion, deutliche Darmhemmung; *C.S.E.* Karotissinusentlastung: Milzkontraktion, keine wesentliche Beeinflussung der Darmmotorik: *Art.* 0,75 γ Arterenol: Milzkontraktion, keine wesentliche Darmbeeinflussung.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

1. Die Arbeiten Cannons[9] über das Freiwerden von „*Sympathin*“ bei der elektrischen Reizung sympathischer Nerven haben gezeigt, daß der die „humorale Übertragung“ der Nervenerregung übernehmende Sympathikusstoff sich nicht in allen Bereichen nervaler Endverästelung wie Adrenalin verhält, mit diesem also nicht schlechthin identifiziert

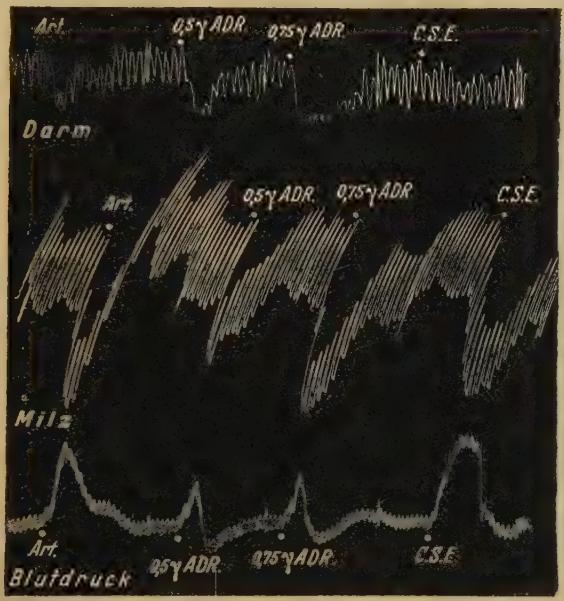


Abb. 8. C.S.E. — Adrenalin — Arterenol. Wie Abb. 7. Art. 1 γ Arterenol; *ADR.* 0,5 bzw. 0,75 γ Adrenalin; *C.S.E.* Karotissinusentlastung.

werden darf. Das von Adrenalin sich unterscheidende Verhalten elektrischer Reizeffekte in verschiedenen Bereichen des sympathischen Systems gegenüber *Ergotoxin* — so erfährt z. B. die bei Reizung der „Lebernerven“ auftretende pressorische Wirkung durch Ergotoxin nicht wie diejenige des Adrenalins eine Wirkungs*umkehr*, sondern nur eine *Abschwächung* —, ferner die beim Sympathikusstoff bestimmter Provenienz im Vergleich mit Adrenalin weit weniger stark ausgeprägte oder überhaupt nicht in Erscheinung tretende inhibitorische Wirkung auf glattmuskelige Organe, z. B. Uterus und Darm, hat dann bekanntlich zu einer Differenzierung in „*Sympathin E*“ mit überwiegend *excitatorischer* Funktion und „*Sympathin I*“ geführt, das auch die vom Adrenalin her bekannte *inhibitorische* Wirkungskomponente besitzt und mit Adrenalin vielleicht identisch ist. Im Anschluß an die Cannonschen

[9] Cannon, W. B. u. A. Rosenblueth: Amer. J. Physiol. **104**, 555 (1933).

Untersuchungen ist von verschiedenen Seiten auf die pharmakologische Ähnlichkeit zwischen *„Sympathin E"* und *Arterenol* hingewiesen worden, das als entmethyliertes Adrenalin — Noradrenalin — chemisch dem Markhormon selbst sehr nahe steht; so wurde bereits

Abb. 9. Blutdrucksteigerung und Milzkontraktion durch Karotissinusentlastung: vor und nach Nebennierenausschaltung. Katze, 2,4 kg. Pernoctonnarkose. *C.S.E.* Karotissinusentlastung; *ADR.* 0,5 γ Adrenalin. Die Blutdruckwirkung bleibt — zwar abgeschwächt — auch nach Entfernung der Nebennieren bestehen, die Milzwirkung hingegen ist vollständig aufgehoben.

mehrfach die Vermutung ausgesprochen, Sympathin E sei identisch mit Arterenol [10].

Vor mehreren Jahren konnten wir selbst[11] in einer Arbeit „Über das sympathikomimetische pressorische Prinzip des Harns", das wir „Urosympathin" nannten, auf Grund vergleichend pharmakologischer Untersuchungen zeigen, daß *Arterenol* als Komponente des „Urosympathins" regelmäßig im *Harn* vorkommt. Es war damit, soweit wir sehen, zum ersten Mal *Arterenol* als *körpereigene Substanz* nachgewiesen.

[10] BACQ, Z. M.: Ann. Physiol. (Fr.) **10**, 467 (1934); Erg. Physiol. **37**, 82 1935. — STEHLE u. ELLSWORTH: J. Pharmacol. (Am.) **59**, 114 (1937). — GREER, C. M., J. O. PINKSTON, J. H. BAXTER u. E. E. BRANNON: J. Pharmacol. (Am.) **62**, 189 (1938). — [11] HOLTZ, P., K. CREDNER u. G. KRONEBERG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 228 (1944/47).

In jüngster Zeit ist es dann, wie wir aus einer uns vor wenigen Tagen in einem kurzen Referat bekannt gewordenen Arbeit und einer persönlichen brieflichen Mitteilung ersehen, U. S. v. Euler[12] in Stockholm gelungen, Arterenol in Milzgewebe und Herzmuskulatur, sowie in Menschen- und Rinderblut nachzuweisen.

2. Schon in der erwähnten, fast 4 Jahre zurückliegenden Arbeit[11] gaben uns Versuche mit *Nebennierenextrakten,* deren pressorische Wirkung durch Ergotoxin und Yohimbin nicht wie diejenige einer äquivalenten Adrenalinmenge beeinflußt wurde, sondern eher wie diejenige eines Adrenalin-Arterenolgemisches, Anhaltspunkte für die Annahme, daß die Nebennieren wie für *Adrenalin,* so auch für *Arterenol* Depotorgan darstellen in dem Sinne, daß Arterenol in der Nebenniere nicht nur kurzlebige, rasch zu durchlaufende Zwischenstufe auf dem Wege zum Adrenalin sei, sondern vielmehr ähnlich wie Adrenalin für *Sympathin I,* so für das *Sympathin E* der sympathischen Nervenendigungen gewissermaßen ein Wirkstoffdepot bilde, aus dem auf bestimmte Reize hin auch eine Ausschüttung als fertiger, selbständiger Wirkstoff erfolgen könnte.

Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führen zu der Fragestellung, ob außer Adrenalin noch andere Substanzen mit Hormoncharakter im Nebennierenmark vorkommen, die dann wie Adrenalin und andere echte Hormone auf den adaequaten Reiz hin als „inneres Sekret" abgegeben werden.

Diese Frage war schon einmal akut, als vor 15 Jahren v. Szent-Györgyi[13] über die Isolierung eines als *„Novadrenalin"* bezeichneten Stoffes aus Nebennierenmark berichtete, der 40—50fach wirksamer sein sollte als Adrenalin und sich von diesem pharmakologisch unter anderem darin unterschied, daß er auch in kleinsten Dosen nicht wie Adrenalin blutdruck*senkend,* sondern blutdruck*steigernd* wirkte. Diese Befunde ließen sich später nicht reproduzieren und haben deshalb keine Bedeutung erlangt. Wir möchten darauf hinweisen, daß Arterenol zwar *etwas,* aber nicht *viel* wirksamer als Adrenalin ist, wenn man die gefäßkonstriktorische Wirkung dem Vergleich zugrunde legt, daß dagegen das dem Novadrenalin zugesprochene Unterscheidungsmerkmal der pressorischen Wirksamkeit auch kleinster Dosen ebenfalls für Arterenol zutrifft, wie uns immer wieder bei unseren Blutdruckversuchen an der Katze auffiel.

Wir glauben durch unsere Versuche bewiesen zu haben, daß die im Gefolge einer Karotissinusentlastung aus den Nebennieren zur Ausschüttung kommende und ans Blut abgegebene Substanz, die am Zustandekommen der *Blutdrucksteigerung* beteiligt ist und die *Milz* zur Kontraktion veranlaßt, *Blutzuckerspiegel* und *Darm* jedoch unbeeinflußt läßt, nicht Adrenalin sein kann, und es sehr wahrscheinlich gemacht zu haben, daß sie Arterenol ist. Die *pharmakologischen Unter-*

[12] Euler, U. S. v.: J. Physiol. (Brit.) **105**, 26, 38 (1946). Zit. nach Chem. Zbl. **1947 II**, 56. — Acta Soc. physiol. scand. (D.) **13**, (1946). — [13] Szent-Györgyi, A. v.: Dtsch. med. Wschr. **1932**, 852.

schiede zwischen *Arterenol* — „Sympathin E" — und *Adrenalin* — „Sympathin I", z. B. die im Vergleich mit Adrenalin 20fach schwächere Blutzuckerwirkung und die nur schwach ausgebildete darmhemmende Wirkung des Arterenols bei voll ausgeprägter Wirkung auf Herz und Gefäße, lassen es *zweckmäßig* erscheinen, daß die von den pressosensiblen Zonen des Karotissinus ausgehenden Kreislaufreflexe und -regulationen sich eines „Effektors" bedienen können, der sich *elektiv* auf die Ausführung der *unmittelbar* erteilten, eben nur die Regulation des Kreislaufs betreffenden Befehle beschränkt, und nicht wie Adrenalin als „Effektor" das tun würde, eine allgemein sympathikotonische Umstellung des gesamten autonomen Systems herbeiführt. Es könnte so sein, daß diese „Systemwirkung" des Adrenalins vom Organismus nur wenn höchste Anforderungen gestellt werden, nur in Fällen der Not — eben als *„Notfallsfunktion"* im Sinne Cannons — herangezogen wird, während für die Erfüllung der *„physiologischen"* Aufgaben und Anforderungen die mehr spezialistische Wirkung des Arterenols ausreicht, indem es in unterschwelliger Dauersekretion aus den Nebennieren auf dem Blutwege die Sympathindepots an den sympathischen Nervenendigungen auffüllt und unter dem Einfluß von Reizen bestimmter Intensität eine Sekretionssteigerung erfahren kann, die dann zuerst im Bereich der Organe des Kreislaufs den Schwellenwert der Wirkung übersteigt.

Offen bliebe die Frage nach dem *Mechanismus,* mit dem es in den Nebennieren zu einer differenzierten Infreiheitsetzung, einer isolierten Sekretion und Ausschüttung von Adrenalin *oder* von Arterenol kommt, je nach der „Reizfrequenz", der Reizintensität, von der die Drüse auf dem Wege der Splanchnici getroffen wird.

3. Im Rahmen dieser Vorstellungen fände dann das *„Sympathin I"* Cannons als ein von Arterenol verschiedener, an sympathischen Nervenendigungen freiwerdender Stoff wohl keinen Platz mehr. So wenig daran zu zweifeln ist, daß die Substanz, die Takamine vor fast 50 Jahren aus Nebennierenmark isolierte und kristallisiert gewann, wirklich *Adrenalin* war und daß dieses Nebennierenadrenalin von der Drüse, wenn starke Reize sie treffen, tatsächlich zur Ausschüttung ins Blut gebracht wird, so zweifelhaft erscheint es uns, ob die Substanz, die in den Versuchen Cannons bei elektrischer Reizung z. B. der Nn. splanchnici auch nach Ausschaltung der Nebennieren — „adrenals tied off"[14] — in Aktion tritt und sich wie Adrenalin *verhält* und wohl auch Adrenalin *ist,* indem sie anders als *Arterenol* nach Ergotoxin blutdrucksenkend wirkt und den Katzenuterus zur Erschlaffung bringt, als „Sympathin I" an den Nervenendigungen frei geworden ist. Wir halten es vielmehr nach allem für wahrscheinlicher, daß es *nur ein* „Sympathin" gibt, d. h. *nur einen* Sympathikusstoff, der von sympathischen Nerven

[14] Cannon, W. B. u. A. Rosenblueth: Amer. J. Physiol. **104**, 557 (1933). Abb. 4.

sezerniert wird, wenn sie in Erregung geraten, nämlich *Arterenol,* (in physiologischer Dauersekretion von den Nebennieren abgegeben, um die Sympathinvorräte der sympathischen Nerven immer wieder aufzufüllen), und daß auch bei Reizung des Splanchnicus trotz der Adrenalinwirkung, welche diese Reizung hat, an den Nervenendigungen *Arterenol* und nicht Adrenalin frei wird, dieses vielmehr aus akzessorischem chromaffinen Gewebe stammt, wo es auf den nervösen Reiz hin in Freiheit gesetzt wurde, und nunmehr die Wirkung des Arterenols überdeckt.

Diese Auffassung, die im *Arterenol* den eigentlichen *physiologischen Sympathikusstoff* erblickt und das In-Aktion-treten von *Adrenalin* gewissermaßen auf die Ausübung von *„Notfallsfunktionen"* beschränkt, fände eine Stütze in dem Ergebnis unserer schon erwähnten, mehrere Jahre zurückliegenden Untersuchungen[11] über das sympathikomimetische pressorische Prinzip des normalen Harns — „Urosympathin": daß nämlich „die Annahme, das pressorische Prinzip des Harns bestehe aus Oxytyramin und *Arterenol,* die beobachteten Wirkungen erklären würde". Wenn wir dann damals weiter schrieben: „Obwohl somit die tatsächlichen Befunde mit der Annahme eines im Harn vorliegenden Gemisches aus *zwei* Komponenten — *Arterenol* und Oxytyramin — ausreichend erklärt zu sein scheinen, dürfte es wahrscheinlich sein, daß Adrenalin als dritte Komponente beteiligt ist . . .", so wäre das jetzt dahin zu ergänzen, daß das Freiwerden von *Adrenalin* und seine Ausscheidung in den Harn unter „normalphysiologischen" Verhältnisse, d. h. bei einer Tonuslage des sympathischen Systems, die mit Hilfe der Sekretion von „Sympathin" an den *Nervenendigungen* aufrecht erhalten werden kann, nicht wahrscheinlich ist, sondern nur in Frage kommt, wenn im Organismus bei erhöhten Anforderungen zwecks Steigerung des Sympathikustonus auf die *Nebennieren* zurückgegriffen und dann als „Notfallsfunktion" der *„Systemstoff"*, das *„Pharmakon"* Adrenalin ausgeworfen wird.

Diese Auffassung stände dann schließlich auch im Einklang mit den ebenfalls schon erwähnten neuesten Befunden v. Eulers[12], der in Milz, Herzmuskulatur und Blut *Arterenol* nachwies, ohne daß sich Anhaltspunkte dafür ergeben hätten, daß neben Arterenol auch *Adrenalin* vorhanden gewesen wäre.

Zusammenfassung.

1. In Versuchen an Katzen und Hunden kommt es bei einer durch Abklemmung beider Karotiden verursachten *Karotissinusentlastung* zu einem Anstieg des *Blutdrucks* und zu einer Kontraktion der *Milz,* jedoch nicht zu einer Erhöhung des *Blutzuckerspiegels* und nicht zu einer Hemmung des *Darmes.*

2. Die durch Karotissinusentlastung veranlaßte *Blutdrucksteigerung* hat ihre Ursache nur zum Teil in der Abgabe einer gefäßverengernden Substanz aus den *Nebennieren*; denn sie tritt — wenn auch in schwächerem Maße — noch nach Ausschaltung der Nebennieren auf. Die bei Karotissinusentlastung auftretende *Milzkontraktion* ist demgegenüber ausschließlich durch die Ausschüttung einer die Kontraktion veranlassenden Substanz aus den *Nebennieren* verursacht; denn sie bleibt nach Exstirpation der Nebennieren aus.

3. Eine *Adrenalinmenge,* welche die *Milz* zu gleichstarker Kontraktion veranlaßt wie die Karotissinusentlastung, verursacht *im Gegensatz* zu dieser auch eine deutliche *Darmhemmung.* Die bei Karotissinusentlastung von den Nebennieren abgegebene milzkontrahierende, den Darm aber kaum beeinflußende Substanz kann deshalb nicht Adrenalin sein.

4. *Arterenol* — Noradrenalin— läßt in Dosen, die eine mit der nach Karotissinusentlastung auftretenden vergleichbare Milzkontraktion hervorrufen, *in Übereinstimmung* mit der Karotissinusentlastung den Darm praktisch unbeeinflußt. Die bei Karotissinusentlastung von den Nebennieren abgegebene *milzwirksame,* aber *darmunwirksame* Substanz könnte deshalb *Arterenol* sein. Es würde dann verständlich, daß es während der Karotissinusentlastung nicht zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels kommt, da Arterenol eine 20fache schwächere glykämische Wirksamkeit als Adrenalin besitzt, und daß der pressorische Effekt der Karotissinusentlastung durch Yohimbin nicht wie die blutdrucksteigernde Wirkung des *Adrenalins* umgekehrt, sondern nur abgeschwächt wird wie diejenige des *Arterenols.*

5. Im Hinblick auf die *pharmakologischen* Unterschiede zwischen Arterenol und Adrenalin erscheint es zweckmäßig, daß dem Arterenol nicht nur der Charakter eines auf dem Wege der biologischen Adrenalinsynthese liegenden chemischen *Intermediärproduktes* zukommt, sondern auch die Funktion des *Sympathikusstoffes,* des selbständigen *Wirkstoffs,* eines isoliert und unabhängig vom Adrenalin sezernierbaren *Hormons* der Nebennieren.

6. Unter Bezugnahme auf frühere eigene Untersuchungen und neuere Befunde anderer Autoren werden die Beziehungen zwischen Arterenol und den „*Sympathinen*" Cannons erörtert. Es wird die Vorstellung entwickelt und begründet, daß es *nur ein* Sympathin gibt, d. h. *nur einen* Sympathikusstoff, der an Nervenendigungen frei wird — *Arterenol,* das in physiologischer Dauersekretion aus den Nebennieren abgegeben wird, um die Sympathinvorräte der sympathischen Nerven aufzufüllen. *Adrenalin* erfährt damit eine gewisse „Entthronung", indem seine Funktion auf solche Fälle beschränkt wird, in denen es zu einer Verschiebung der Tonuslage des gesamten autonomen Nervensystems zur Seite des Sympathikus hin kommt, also auf den „Notfall".

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. Hoffmann) und dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. Weese).

Die Pupilleninnervation als Ausdruck der Wechselwirkung vegetativer Zentren.

Von

H. J. Hufschmidt und W. Rummel.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. April 1948.)

Langendorffs Untersuchungen über die paradoxe Pupillenreaktion sind Ausgangspunkte vieler Deutungen und Experimente gewesen. Es handelt sich um eine spontane oder aber durch Narkose hervorgerufene Erweiterung der zunächst verengten, sympathektomierten Pupille, so daß sich das Verhältnis der Pupillengröße des operierten zum normal innervierten Auge geradezu umkehrt.

Als Ursache dieses Phänomens werden im wesentlichen zwei Faktoren angeführt: Absinken des Oculomotoriustonus (Budge, Levinsohn, Häfter) oder eine „Sensibilisierung" des denervierten Dilatator pupillae gegen Adrenalin (Lewandowsky, Spiegel, Straub, Anderson). Hafters Hinweis auf die Vielfalt der Einflüsse bezüglich des Zustandekommens dieser Reaktion, vor allem auf die Auswirkung der individuell vegetativen Grundstimmung, scheint uns besonders wichtig. In dessen Nichtbeachtung liegt vielleicht auch der Grund der uneinheitlichen Deutung, so daß weder die Durchschneidungsversuche von Lanczos, noch die pharmakologischen Untersuchungen (Lanczos, Beccari, Boriani, Shen und Cannon) oder die Grenzstrangreizungen von Beccari und Casarotto eine allgemein anerkannte Erklärung geben konnten.

Bemerkenswert schien uns an den verschiedenen Untersuchungen der für das Auftreten der spontanen oder experimentell ausgelösten (pharmakologische und Durchschneidungsversuche) paradoxen Reaktion immer gleichbleibende zeitliche Abstand von 24—48 Stunden seit der ersten Sympathektomie. Daraus erwuchs die Frage: Haben alle nach einer gleichbleibenden zeitlichen Latenz die paradoxe Pupillenreaktion hervorrufenden Eingriffe eine gemeinschaftliche Wurzel?

Methodik.

Versuchstiere waren *Rana esculenta* und *temporaria*. Wegen Fehlens einer konsensuellen Pupillenreaktion (Gaupp) hielten wir Frösche für besonders geeignet. Die Sympathektomie wurde nach Kahn in Äthernarkose durchgeführt. Das oberste Cervicalganglion wurde ganz entfernt. Um Narkose und Schmerzeinfluß auszuschließen, bereiteten wir in der ersten Sitzung die Tiere für eine zweite

Sympathektomie so vor, daß wir eine feine Fadenschlinge um den Grenzstrang oberhalb des zweiten Ganglions (nach Gaupp) anlegten und dieselbe an der Schleimhaut des Rachendaches befestigten. So konnte die zweite Sympathektomie im Wachzustand leicht durchgeführt werden. Die Rückenmarksdurchtrennung führten wir ebenfalls ohne Narkose durch einen Scherenschlag vom Rücken her aus. In der Versuchsreihe, in welcher wir den Boden des Zwischenhirnes durchtrennten, wurde das Gehirn mittels kleiner Trepane von der ventralen Seite her freigelegt. Durchschnitten wurde lediglich der Boden des dritten Ventrikels zwischen dem Chiasma und dem Nerv. III. Der Erfolg sämtlicher Operationen wurde autoptisch kontrolliert. Die Pupillengröße maßen wir laufend mit einer Schublehre, so daß die Branchen das Oval der Froschpupille am oberen und unteren Pol, also im kleinen Durchmesser, tangierten. Der Meßfehler betrug nicht über 0,1 mm. Zur kritischen Auswertung der Pupillenmessung ist die Beachtung der Schmerzreaktion sowie die Verengerung der Pupillen durch das „in die Hand nehmen" zu berücksichtigen. Wie bekannt, tritt die Pupillenerweiterung auf Schmerzreize auch am sympathektomierten Auge auf (Gellhorn, Hodes, Seybold und Moore). Die bisherige Nichtbeachtung des „in-die-Hand-Nehmens" setzt uns vor allem in Verwunderung, da sie jede Messung von Grund auf verderben kann. Nimmt man einen Frosch in die Hand, so bewirkt dieser Reiz in jedem Falle eine sofortige Verengerung der normal innervierten Pupille, während die sympathektomierte sich nicht verändert, so daß bei geringgradigen Unterschieden der Ausgangswerte dadurch eine Umkehr leicht vorgetäuscht werden kann, wenn nicht durch die Messung deutlich wird, daß der Verengerung auf der normal innervierten Seite keine Erweiterung auf der operierten Seite entspricht. Für gleichbleibende Belichtung wurde stets gesorgt. Die Zahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen betrug 10—20 Stück.

Versuchsergebnisse.

Anstoß zu unseren Versuchen gab uns die bereits von Langendorff und Anderson mitgeteilte Beobachtung, daß im Verlauf einer Narkose nach der vor einigen Tagen durchgeführten Sympathektomie, eine ausgesprochene paradoxe Reaktion eintrat. Und zwar wird, wie wir beobachten konnten, nicht nur die Pupille des vorher operierten Auges weiter, sondern die des normalen zur gleichen Zeit enger (Abb. 1).

In der Versuchsgruppe A ermittelten wir nun, wieviel Stunden zwischen der Sympathektomie und einer nochmaligen Narkose liegen mußten, um eine solche paradoxe Reaktion auftreten zu lassen. Wir überzeugten uns, daß die benötigte Zeitspanne 24—48 Stunden war. Von dieser Zeit ab kann, wie auch die früheren Untersucher mitteilten, das Phänomen stets hervorgerufen werden. Die Umstimmung ist also eine dauernde. Um die Möglichkeit der Auswirkung einer Adrenalinausschüttung im Sinne etwa der „Sensibilisierung" des denervierten Dilatator pupillae auszuschließen, machten wir dieselben Narkoseversuche an Tieren, denen wir nicht nur die Nebennieren kauterisierten, sondern, um ganz sicher zu gehen, die Nieren samt Nebennieren total entfernten. Diese Tiere der Versuchsgruppe B zeigten dasselbe Verhalten.

So müssen wir denn eine nervöse Regulation annehmen. Wir wiederholten daher die „zweizeitige Sympathektomie“ von Lanczos — Versuchsgruppe C, welche in ihrem Erscheinungsbild mit der soeben beschriebenen Narkosereaktion identisch ist (Abb. 2).

Durch unsere Operationsart konnte ein Überdecken durch die „Narkoseumkehr“ ausgeschlossen werden. Auch hier betrug die Zeitspanne bis zum Auftreten der paradoxen Reaktion 24—48 Stunden (nach der ersten Durchschneidung).

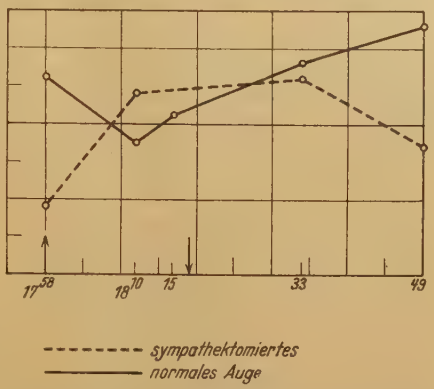


Abb. 1. Der Abstand von der Grundlinie gibt die Pupillenweite an. 1 mm auf der Zeichnung entspricht 0,1 mm am Objekt. 1. Pfeil: Narkosebeginn, 2. Pfeil: Wiederaufnahme der Atmung und Rückkehr des Umkehrreflexes.

Da wir uns über die Übereinstimmung der vorhergehenden Versuchsreihen, der Narkose und der „zweiten Sympathektomie“ besondere Vorstellungen machten, erhofften wir uns von einer Rückenmarksunterbrechung eine Erhärtung derselben — Versuchsgruppe D. Durchtrennt wurde zwischen dem Abgang des obersten Spinalnerven und der untersten Spitze der Rautengrube, so daß das Centrum cilio spinale nicht beschädigt wurde. Auch hier zeigte sich die paradoxe Pupillenreaktion in ganz eklatanter Weise (Abb. 3).

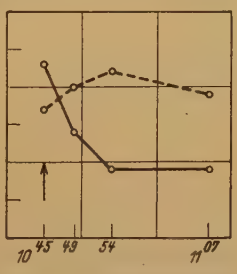


Abb. 2. Die gestrichelte Linie entspricht dem vorher operierten Auge. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt, der im Wachzustand am kontralateralen Grenzstrang durchgeführten „2. Sympathektomie“.

Zur Ergänzung wurde die Durchtrennung des Rückenmarkes 48 Stunden nach gleichzeitig doppelseitiger Sympathektomie durchgeführt — Versuchsgruppe E. Beide Pupillen erweiterten sich maximal. Wurde ein gleichzeitig doppelseitig sympathektomiertes Tier nach Ablauf von 24—48 Stunden erneut narkotisiert — Versuchsgruppe F — so zeigte sich das gleiche Bild. Um eine undefinierte, etwa allgemeine Reizung des Rückenmarkes auszuschließen, durchtrennten wir dasselbe an einer Reihe von Fröschen in verschiedenen Segmenthöhen — Versuchsgruppe G. Nur die Durchschneidung in erstgenannter Höhe führt zum Erfolg. Die zur Kontrolle an Normalfröschen durchgeführten Rückenmarksdurchtrennungen zwischen Medulla oblongata und dem ersten Spinalnerven — Versuchsgruppe H — führten nur wenig

Änderung herbei, einmal im Sinne einer Verengerung, einmal einer Erweiterung der Pupille.

Wir prüften daraufhin die Selbständigkeit des Centrum ciliospinale; es zeigte sich, daß ein vorher nicht einseitig sympathektomiertes Tier nach Halsmarkdurchtrennung auf eine *nachfolgende* einseitige Sympathektomie am entsprechenden Auge mit einer Miosis reagierte — Versuchsgruppe I. Dies steht im Gegensatz zu der Halsmarkdurchtrennung an *vorher* einseitig sympathektomierten Tieren, welche ja, wie aus den Versuchsergebnissen ersichtlich, nicht nur Mydriasis der sympathektomierten Pupille, sondern auch Miosis der noch normal innervierten Pupille zeigten. Es besteht also seltsamerweise eine Diskrepanz zwischen Normalfröschen und einseitig sympathektomierten Fröschen hinsichtlich der Eigenständigkeit des Centrum ciliospinale, denn die Pupille des normal innervierten Auges dieser einseitig sympathektomierten Tiere verengt sich deutlich nach der Halsmarkdurchtrennung.

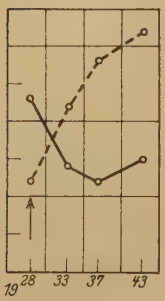


Abb. 3. Die gestrichelte Linie entspricht der vor 24 Stunden sympathektomierten Pupille. Der Pfeil deutet den Augenblick der Rückenmarksdurchtrennung an.

Der Klärung dieses verschiedenartigen Verhaltens diente Versuchsgruppe K. Es wurde der Boden des Lobus infundibularis durchtrennt, nachdem vor 24 Stunden einseitig sympathektomiert wurde. Das Ergebnis war wiederum die paradoxe Pupillenreaktion: Die sympathektomierte Pupille erweitert sich, die normale wird enger. Durchtrennten wir nun gleichzeitig mit der einseitigen Sympathektomie den Boden des dritten Ventrikels, so zeigten diese Frösche — und das erscheint uns als der bedeutungsvollste Versuch — stets und ohne Ausnahme im Verlaufe von 24 Stunden die paradoxe Pupillenreaktion, so wie es Langendorff als manchmal spontan auftretendes Phänomen nach einseitiger Sympathektomie beschrieben hat. Die auf diese Operation erfolgte Umkehr bleibt im Gegensatz zu der von uns ebenfalls beobachteten „spontanen Umkehr" nicht nur 1—2 Tage, sondern 8—14 Tage bestehen — Versuchsgruppe L.

Eine letzte Versuchsreihe M galt der sog. „Überempfindlichkeit" oder „Sensibilisierung" der sympathektomierten Pupille gegen Adrenalin. Nur bei durchaus unphysiologischen Dosen (mindestens 1 cm^3 einer 1 : 500000 Lösung in den Rückenlymphsack injiziert) gelingt es beim Frosch eine stärkere Erweiterung des operierten Auges herbeizuführen. Wesentlich scheint uns, daß dieser Effekt ebenfalls erst 24—48 Stunden nach vorangegangener Sympathektomie auftritt.

Besprechung.

Da die Versuchsreihe der epinephrektomierten Tiere (Gruppe B) ebenfalls die paradoxe Reaktion in nochmaliger Narkose zeigten, müssen wir eine nervöse Ursache dieser Erscheinungen annehmen. Die normalerweise im Verlaufe einer Narkose eintretende Miosis beider Augen möchten wir als ein früheres Absinken des Dilatatorentonus im Sinne der üblichen Reihenfolge der Narkotisierung des ZNS deuten (s. KILLIAN). An vor 48 Stunden einseitig sympathektomierten Tieren wäre demnach das Absinken des Dilatatorentonus im Verlaufe einer nochmaligen Narkose, welches sich an der normal innervierten Pupille als Miosis zeigt, auch für das Auftreten der Mydriasis an der sympathektomierten Pupille verantwortlich, da das auf das operierte Auge allein wirkende Sphincterzentrum nach Ablauf von 24—48 Stunden auf eine Senkung des Dilatatorentonus ebenfalls mit einer Senkung seines eigenen Tonus antwortet. Diese Vorstellung postuliert zwei Annahmen: 1. Im Verlauf von 24—48 Stunden sinkt der Tonus des Sphincterzentrums am sympathektomierten Auge herab, da ihm der Gegenspieler fehlt; 2. der so abgesunkene Tonus des Sphincterzentrums wird in seiner Höhe durch Impulse vom Centrum ciliospinale aufrechter halten über eine zwischen den beiden Zentren verlaufende Verbindung. Ist diese Hypothese richtig, so müßte es jedesmal bei irgendeiner Beeinträchtigung des Dilatatorentonus, so wie bei jeglicher Unterbrechung der geforderten Verbindung zwischen beiden Zentren zu einer Mydriasis der vor 24 bis 48 Stunden sympathektomierten Pupille kommen und außerdem müßte sich an dieser Pupille ein gegenüber der normalen Seite erniedrigter Acetylcholinspiegel nachweisen lassen.

Zur Erhärtung der zweiten Forderung führen wir die Versuche von LEVINSON an. Dieser Autor fand, daß die sympathektomierte Pupille wesentlich träger und langsamer auf Eserin reagiert als die normal innervierte. Die erste Forderung konnten wir zureichend durch unsere Versuche beweisen: Die mechanische Blockade der geforderten Verbindung zeigt die Rückenmarksdurchschneidung in Versuchsgruppe D: Mydriasis der sympathektomierten Pupille. Außerdem müßte auch bei gleichzeitig doppelseitig sympathektomierten Tieren (Gruppe E und F) sich die Bedeutung dieser Verbindung durch Rückenmarksdurchschneidung, sowie die Beeinträchtigung des Tonus des Dilatatorenzentrums durch eine nochmalige Narkose für das Sphincterzentrum beider Pupillen in einer beiderseitigen Mydriasis zeigen. Daß es sich um eine spezifische und streng zu lokalisierende Wirkung handelt, beweist Versuchsgruppe F. Die Durchschneidung des Rückenmarkes in verschiedenen Segmenthöhen führt nicht zum Ziele, falls sie nicht oberhalb des Austrittes vom ersten Spinalnerven erfolgt.

Bisher lassen sich aus unserer Deutung folgende Hauptpunkte zusammenstellen (s. hierzu Abb. 4):

1. Nach einer einseitigen Sympathektomie wird im Verlauf von 24—48 Stunden das Sphincterzentrum in auffallender Weise vom spinalen Dilatatorenzentrum abhängig.

2. Diese Abhängigkeit postuliert eine Verbindung, welche innerhalb der angegebenen Zeitspanne an Bedeutung gewinnen muß.

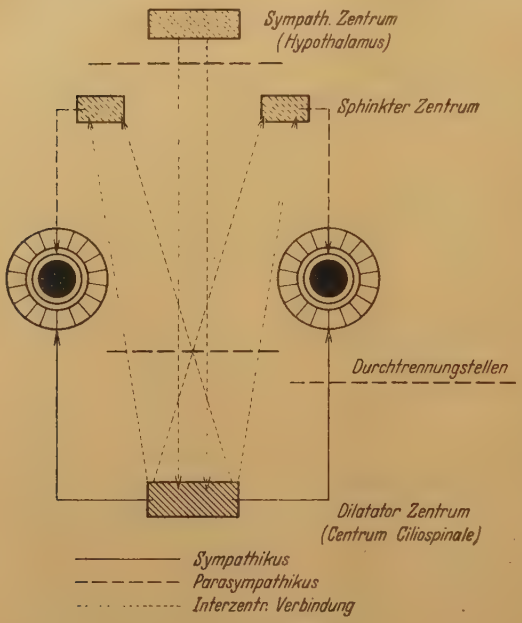


Abb. 4.

3. Bei Unterbrechung dieser Verbindung sinkt der Tonus des Sphincterzentrums herab.

4. Wahrscheinlich vermittelt diese Verbindung die Tonussenkung des Centrum ciliospinale dem Sphincterzentrum, was daraufhin seinerseits mit einer Tonusabnahme antwortet.

Es ist auf Grund dieser Folgerungen nun möglich, das spontane Auftreten der paradoxen Pupillenreaktion durch ein von selbst erfolgendes Absinken des Dilatatorentonus zu erklären, zumal nicht nur das sympathektomierte Auge weiter, sondern auch das normal innervierte Auge zugleich enger wird. Dabei erhebt sich jedoch die Frage: Warum tritt diese Tonusverminderung des Dilatatorenzentrums und die daraus nach unserer Deutung resultierende paradoxe Pupillenreaktion nur bei einer geringen Anzahl der einseitig sympathektomierten Tiere auf, um nach einiger Zeit von selbst wieder zu verschwinden?

Zur Klärung dieser Frage stellten wir zunächst eine zweite Arbeitshypothese auf: Der Eigentonus des Centrum ciliospinale geht stets nach einer einseitigen Sympathektomie im Laufe von 24—48 Stunden verloren; zu gleicher Zeit springt jedoch ein übergeordnetes sympathisches Zentrum ein, welches den so sinkenden Tonus auf sein altes Niveau zu heben versucht. Ist diese zweite Hypothese richtig, so müßte das Absinken des Eigentonus des Centrum ciliospinale innerhalb von 48 Stunden nach einer einseitigen Sympathektomie immer zu finden

sein. Und zweitens müßte nach Unterbrechung der geforderten zentralen Verbindung, welche innerhalb 24—48 Stunden nach vorangegangener Sympathektomie den so absinkenden Eigentonus des Centrum ciliospinale fortlaufend wieder auffüllt, dieser letztere sofort absinken, da, wie gesagt, das Centrum ciliospinale in dieser Zeitspanne seinen Eigentonus bereits verliert. Als Resultat müßten wir wiederum die paradoxe Pupillenreaktion erwarten.

Die Rechtfertigung dieser zweiten Hypothese sehen wir zunächst in den Prüfungsergebnissen der Eigenständigkeit des Centrum ciliospinale. Bei einer Rückenmarksdurchtrennung an unoperierten Tieren zwischen dem ersten Spinalnerven und der Medulla oblongata (Gruppe H) zeigten sich nur geringgradige Schwankungen der Pupillenweite. Wurde nach dieser Halsmarkdurchtrennung nachträglich sympathektomiert, so trat eine deutliche Miosis an der entsprechenden Seite auf (Gruppe I). Damit wurde eine weitgehende Eigenständigkeit des Centrum ciliospinale beim unoperierten Tiere nachgewiesen. Diese Eigenständigkeit geht aber auf jeden Fall 24—48 Stunden nach einseitiger Sympathektomie verloren, was eindeutig aus den Ergebnissen der Rückenmarksdurchtrennung (Gruppe D) hervorgeht; denn im Gegensatz zu unoperierten Tieren (Gruppe H) wird hier die normal innervierte Pupille sofort enger. Würden wir also jetzt nach der Rückenmarksdurchtrennung, wie wir es in Gruppe I an unoperierten Tieren getan haben, ein normal innerviertes Auge sympathektomieren, so käme es zu keinem auslösbaren Effekt mehr, da weitgehende Miosis durch die Rückenmarksdurchtrennung bereits eingetreten ist. Es beweist dieser Versuch nicht nur den Verlust des Eigentonus des spinalen Dilatatorenzentrums, sondern zugleich die Unterbrechung einer von „oben" kommenden sympathischen Bahn, sonst würde die Rückenmarksdurchtrennung an dem noch vollständig innervierten Auge sich nicht wie eine Sympathektomie bemerkbar machen.

Es lag nahe, den Ausgangspunkt dieses kompensatorischen Einflusses in das Gebiet der vegetativen Zentren des Hypothalamus zu legen, da ja Karplus und Kreidl durch elektrische Reizung dieser Areale über den Grenzstrang eine Pupillendilatation erreichen konnten, was neuerdings durch Hess in genauer Lokalisation seine Bestätigung erfuhr. In der Tat zeigte sich, daß die Durchtrennung des Zwischenhirnes 24—48 Stunden nach vorangegangener einseitiger Sympathektomie zu demselben Erscheinungsbild führte wie eine Narkose oder Rückenmarksdurchtrennung. Auch durch diese Beeinträchtigung des Tonus des Centrum ciliospinale kommt es rückläufig zu einer wesentlichen Herabminderung des Sphinctertonus. Wir forderten nun weiter, daß bei einer zur *gleichen* Zeit mit der einseitigen Sympathektomie ausgeführten Zwischenhirndurchtrennung, d. h. bei Fehlen jeglicher

Möglichkeit eines kompensatorischen Einspringens der sympathischen Zwischenhirnzentren, die paradoxe Pupillenreaktion als Ausdruck des stets erfolgenden Verlustes der Eigenständigkeit des Centrum ciliospinale im Verlauf von 24—48 Stunden eintreten müßte. Dies wurde durch unsere Ergebnisse in jedem Falle bestätigt.

Wahrscheinlich ist es nicht fehlgegriffen, wenn wir für das spontane Auftreten der paradoxen Pupillenreaktion nach 24—48 Stunden das Absinken des Dilatatorentonus, hervorgerufen durch einseitige Sympathektomie, verantwortlich machen; und ihr Verschwinden nach einiger Zeit mit dem Einspringen des Sympathicuszentrums im Zwischenhirn erklären. In den meisten Fällen geht „Absinken" und „Einspringen" Hand in Hand, so daß es nie zu einer solchen paradoxen Reaktion kommt. Ist dies aber nicht der Fall, kommt die Kompensation gewissermaßen zu spät, so tritt die paradoxe Reaktion auf. Möglicherweise ist dies von der individuellen vegetativen Grundstimmung abhängig, und daher nicht in allen Fällen zu finden. Auffallend ist, daß meist Tiere mit dunkler Hautfarbe (Vagotonus) dieses Verhalten zeigen und nach Zwischenhirndurchtrennung, wie schon Schürmeyer beobachtete, und wir selbst in jedem Falle sahen, bei auch vorher ständig hellen Tieren eine ausgesprochen Dunkelfärbung eintritt.

Auf ein Vorhandensein der von uns geforderten, auch über Kreuz verlaufenden verbindenden Bahn (Schema) weisen bereits die Ergebnisse der elektrischen Reizversuche Beccaris und der pharmakologischen Versuche mit einseitiger Instillation hin. Der Zusammenhang zwischen dem hypothalamischen Sympathicuszentrum und der Peripherie der sich aus den Versuchen von Karplus und Kreidl und den unsrigen ergibt, findet in den Degenerationsversuchen von Huet seine anatomische Bestätigung. Dieser Autor exstirpierte beim jungen Kaninchen das oberste Grenzstrangganglion und fand nach einer gewissen Zeit umfangreiche Degenerationen, die sich vom Rückenmark bis zum Zwischenhirn hinzogen. Darüber hinaus sollen ausgedehnte Faserzüge degenerieren, welche mit dem dorsalen Vaguskern in Verbindung stehen. Hier würde sich die Deutung von Lanczos einordnen lassen, welche ja die paradoxe Reaktion auf eine „zweizeitige Sympathektomie" hin als einen über den Vagus gehenden Reflex auffaßte; unausgemacht bleibt, ob die Beeinflussung des Sphincterzentrums ausschließlich über den dorsalen Vaguskern geht, oder aber direkte Verbindungen unterhalten werden.

Diese allgemein wenig beobachteten Unterrichtungsmöglichkeiten zwischen zwei in der Peripherie sich antagonistisch auswirkenden Zentren, wie sie unsere Versuche kenntlich machen, sind wohl von wesentlicher Bedeutung für die zu einem normalen Wechselspiel notwendigen tonischen Abstimmungen. Wir sehen daher in der Arbeit von Kuntz

und Mitarbeitern eine direkte Bestätigung unserer Auffassung: bei Reizung des Oculomotorius tritt nach Miosis eine sich anschließende kurzdauernde Mydriasis der gleichnamigen Pupille auf; nach Durchschneidung des sympathischen Grenzstranges fiel diese Reaktion fort. Wenn wir nun unter Antagonismus die gleichzeitig mit der Wirkungssteigerung des Agonisten eintretende Wirkungshemmung des Antagonisten verstehen, so sind wir offensichtlich nicht mehr, was die Wechselwirkung zwischen dem sympathischen und parasympathischen Pupilleninnervations*zentrum* anbelangt, berechtigt, von einem einfachen Antagonismus dieser Zentren zu sprechen. Vielmehr handelt es sich um eine tonusmäßig gleichsinnig gerichtete Abhängigkeit des Sphincterzentrums vom Dilatatorenzentrum. Daß umgekehrt etwas Entsprechendes besteht, darauf weisen die Arbeiten von Anderson und Blume hin mit dem Befund der paradoxen Pupillenkonstriktion.

So erklärt sich die bei den verschiedenen auslösenden Momenten gleiche zeitliche Abhängigkeit des Auftretens der paradoxen Pupillenreaktion von durchschnittlich 24—48 Stunden als die zur tonischen Umstellung notwendige Zeitspanne auf. Wir glauben deshalb auch, die sog. „Überempfindlichkeit" der sympathektomierten Pupille gegen Adrenalin, die sich ebenfalls erst nach 24—48 Stunden zeigt, mit dem Absinken des Sphinctertonus in Verbindung setzen zu können.

Zusammenfassung.

1. Durch eine einseitige Sympathektomie wird das Sphincterzentrum der entsprechenden Pupille vom Dilatatorenzentrum im Rückenmark abhängig.

2. Durch eine einseitige Sympathektomie kommt es außerdem zu einem Tonus-Absinken des Centrum cilio spinale.

3. Zwischen Sphincter- und Dilatatorenzentrum wurde die funktionelle Tätigkeit einer Verbindung festgestellt, dergestalt, daß diese bei Senkung des Dilatatorentonus die Wirkung an das Sphincterzentrum übermittelt, welches daraufhin seinerseits in seinem Tonus absinkt.

4. Dieses Absinken des zentralen Sphinctertonus wird sich nur an *der* Pupille als Mydriasis zeigen, der 1. der dilatatorische Gegenspieler fehlt und dadurch 2. das entsprechende Sphincterzentrum in erhöhte Abhängigkeit vom Dilatatorenzentrum geraten ist.

5. Der Begriff des Antagonismus erschöpft keineswegs das Wechselspiel dieser vegetativen Zentren. Besser spräche man von einer tonusmäßig gleichsinnig gerichteten Abhängigkeit.

6. Beim Kaltblüter versucht das hypothalamische Sympathicuszentrum den durch eine einseitige Sympathektomie herabgesunkenen Tonus des Centrum ciliospinale kompensatorisch wieder zu heben.

7. Besteht zwischen dem „Absinken" einerseits und dem „Einspringen" andererseits zeitlich eine Diskrepanz, so resultiert daraus die von Langendorff beschriebene paradoxe Pupillenreaktion.

8. Die zu allen hier in Frage stehenden tonischen Umstellungen benötigte Zeit beträgt 24—48 Stunden.

9. Die „Überempfindlichkeit" der sympathektomierten Pupille gegen Adrenalin glauben wir mit dem Absinken des Sphinctertonus hinlänglich erklären zu können.

Literatur.

Anderson, H. K.: J. Physiol. (Brit.) **30**, 15, 290 (1904); **32**, 156, 414 (1905/06). Beccari, E.: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **13**, 93 (1938). Zit. nach Rona-Ber., **109**, 322 (1939). — Beccari, E. u. T. Casarotto: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **12**, 361 (1937). Zit. nach Rona-Ber. **105**, 278 (1938). — Blume, W.: Arch. exper. Path. (D.) **164**, 226 (1931). — Boriani, A.: Arch. Fisiol. (It.) **40**, 218 (1940). Budge: Zit. nach O. Langendorff, Mbl. Augenhk. **38**, 129, 823 (1900). — Gaupp: Anatomie des Frosches, 3. Aufl. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1896. — Gellhorn: Zit. nach J. F. Fulton, Physiology of the nervous system, S. 204. 1943. — Hafter, E.: Pflügers Arch. **229**, 447 (1932). — Hess, W. R.: Helvet. physiol. Acta, Suppl. **4** (1947). — Hodes, R.: Amer. J. Physiol. **131**, 144 (1940). — Huet, K. G.: Pflügers Arch. **137**, 627 (1911). — Kahn, R. H.: Pflügers Arch. **192**, 93 (1921). — Karplus u. Kreidl: Pflügers Arch. **143**, 125 (1912). — Killian, H.: Narkose, S. 229. Berlin: Springer 1934. — Kuntz, A. and Calvin A. Richins: J. Neurophysiol. **9**, 1 (1946). — Lanczos, A.: Pflügers Arch. **238**, 546 (1937). — Arch. internat. Pharmacodynam. **61**, 220 (1939). — Langendorff, O.: Mbl. Augenhk. **38**, 129, 823 (1900). — Levinsohn, G.: Mbl. Augenhk. **38**, 625 (1900). — Lewandowsky: Ber. Berl. Akad. **1900**, Nr 52. — Schürmeyer, A.: Klin. Wschr. **1926** II, 2311. — Seybold, W. and N. M. Moore: J. Neurophysiol. **3**, 436 (1940). — Shen, S. C. u. W. S. Cannon: Chin. J. Physiol. **10**, 359 (1936). Zit nach Rona-Ber. **97**, 507 (1937). — Spiegel, E. A.: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 10, S. 1063. Berlin: Springer 1927. — Straub, H.: Pflügers Arch. **134**, 15 (1910).

Aus dem Zahnärztlichen Institut (Direktor: Prof. Dr. Euler) und dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler) der früheren Universität Breslau.

Über die Wirkung einiger organischer Fluoride bei chronischer Darreichung.

Von

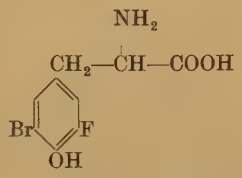
H. Euler, O. Eichler und H. Hindemith.

(Eingegangen am 2. April 1948.)

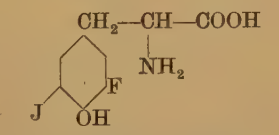
In einleitenden Versuchen [1,2] hatte es sich herausgestellt, daß Fluor in organischer Bindung von Fluortyrosin, und zwar im Verband des Moleküls in der Lage ist, bei chronischer Darreichung am Knochen Veränderungen herbeizuführen, die denen nach anorganischen Fluoriden durchaus gleichen. Da diese ebenso wie Fluortyrosin das Fluor im Anion, also mit negativer Ladung enthalten, wurde versuchsweise in dieser Eigenschaft eine Bedingung gesucht. Die bisher vorliegenden Mitteilungen von Kempf und Nelson [3] fanden Wirksamkeit bei p-Fluorbenzoesäure aber ebenso bei Fluorbenzol, waren also nicht zu Gunsten dieser Annahme. Auch die hier referierten Erfahrungen deuten nicht in diese Richtung. Unser Vorhaben ging jedoch darüber hinaus, indem eine Beziehung zu Fermentsystemen (Gärung, Phosphatasen) gesucht wurde.

Uns standen folgende Verbindungen zur Verfügung*: (Den Formeln fügen wir zum Teil die akute tödliche Dosis bei der Maus nach subkutaner Applikation bei).

I. *D 19.* 3-Fluor-5-Bromtyrosin. Schmelzpunkt 226/227°. Fluorgehalt 7%. Dosis let. 78 mg/kg.



II. *K 3.* Jodfluortyrosin. 6% Fluor. Tödlich 57 mg/kg Maus.

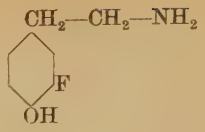


---

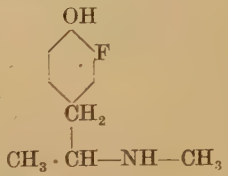
[1] Euler, H. u. O. Eichler: Arch. exper. Path. (D.) **199**, 179 (1942). — [2] Euler, H. u. O. Eichler: Dtsch. Zahn- usw. Hk. **9**, H. 1 (1942). — [3] Kempf, C. A. u. V. E. Nelson: Proc. Towa Acad. Sci. **43**, 197 (1936). — J. Labor. a. clin. Med. (Amer.) **22**, 1133 (1937).

* Die Herstellung der meisten Präparate verdanken wir Herrn Dr. phil. habil. K. Kraft, Ludwigshafen, die von Phthiocol und Fluorphthiocol Herrn Prof. O. Neunhöffer vom Breslauer Chemischen Institut.

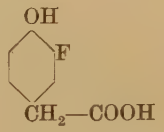
III. *K 4.* Fluortyramin. 10% Fluor. Tödlich > 1 g/kg.



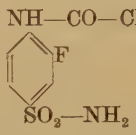
IV. *H 2 0.* 1-(3-Fluor-4-oxy)-phenyl-1-methyl-2-methyl-aminoaethan (luoriertes Veritol) 4% Fluor. Tödliche Dosis 550 mg/kg.



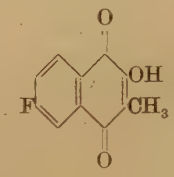
V. *K 17.* 3-Fluor-4-oxy-phenyl-essigsäure. Tödliche Dosis 3,5 g/kg.



VI. *D 22.* 1-Acetamino-2-Fluorbenzolsulfonsäure-amid. Wir nennen die Verbindung der Kürze halber gelegentlich fluoriertes Prontalbin, obwohl hier noch eine Acetylgruppe zugefügt ist. Schmelzpunkt 203/204°. Fluorgehalt 8%.



VII. *N 1.* Fluorphthiocol. 9% Fluor. Schmelzpunkt 178° (ohne F 171°).



Methodik.

Die Versuchstiere waren durchweg Ratten. Die Dosierung wurde so hoch wie irgend möglich gewählt. Natürlich durften nicht akute Wirkungen zustande kommen. Wir kamen so zu folgenden Mengen:

Präparat I. Die zuerst versuchte Menge von 30 mg/kg erwies sich bei 5 Tieren angewandt auf die Dauer als nicht tragbar. Nach 2 bis 3 Tagen traten nach der Fütterung Krämpfe auf. In 24 Stunden hatten sich die Tiere erholt, wurden aber immer schlapper und starben nach 9—17 Tagen. Die Substanz kumulierte offenbar und zwar um so stärker, wenn sie im Futter über den Tag verteilt dargereicht wurde, gegenüber der einmaligen Zufuhr durch Schlundsonde. Es handelte sich dabei nicht um eine Zersetzung in der Nahrung mit Entstehen giftigerer Produkte. Wahrscheinlich ist die Ausscheidung um so rascher, je mehr die Gabe stoßweise zu höheren Konzentrationen im Blut führte. Im allgemeinen wurde hier und später die Substanz im Kartoffelbrei gegeben.

Drei Tiere wurden mit 15 mg/kg behandelt; auch diese Dosis wurde schlecht vertragen, so daß wir schließlich bei 3 weiteren Tieren auf die

Dosis von 10 mg/kg zurückgingen. Diese Dosis wurde 114—120 Tage gegeben. Die Tiere erhielten also täglich 0,7 mg/kg F in organischer Bindung.

Präparat II. Drei Tiere wurden mit 20 mg/kg bis 147mal, 3 weitere mit 15 mg/kg 155 und 157mal behandelt, erhielten also 1,2 bzw. 0,9 mg/kg F in organischer Bindung. Die Tiere waren nach einigen Tagen schreckhaft bei Berührung. Der Gang war darnach unsicher. Die Einfügung von Brom in den Benzolring war also für chronische Gabe ungünstiger als die von Jod.

Präparat III. Drei Tiere wurden 90—156mal mit je 250 mg/kg behandelt. Sie erhielten also je Tag 25 mg/kg F in organischer Bindung.

Präparat IV. Vier Tiere wurden 103—160mal mit 100 mg/kg behandelt. Fluorgehalt 4 mg/kg je Tag.

Präparat V. Wurde nur zu den Fermentversuchen der nächsten Publikation benutzt.

Präparat VI. Zwei Tiere erhielten 99 und 105mal 100 mg/kg, also 8 mg/kg F am Tage.

Präparat VII. Vier Tiere erhielten 54—161mal 50 mg/kg, also 4,5 mg/kg F am Tage.

Da die Präparate schwer zugänglich waren, mußte die Zahl der Tiere klein gehalten werden. Am Ende der Fütterung wurden diese Tiere fast alle getötet (abgesehen von den hohen Dosen von Präparat I), damit die umfangreiche histologische Untersuchung möglichst einwandfrei geschehen konnte. Die histologische Untersuchung betrifft hinsichtlich des Kiefers nur die hier aufgezählten chemischen Körper. Bei den anderen Organen wurden auch unsere Versuche mit NaF und Fluortyrosin, insgesamt 126 Tiere, verwertet. Viele tausend Präparate wurden hergestellt und durchgemustert. Da wir über anorganisches Fluorid schon an sich reichlich Bescheid wissen[4], wurde dieses nur verwandt, um uns durch eigene Anschauung die Unterschiede vor Augen zu führen, abgesehen von der Berücksichtigung weniger seltener untersuchter Drüsen mit innerer Sekretion (Nebenniere, Parathyreoidea).

Veränderungen am Zahnsystem.

I. Leichte Blutstauung in der Pulpa der Molaren, im Nagezahn die Pulpa leicht geschrumpft.

II. Leichte Hyperämie der Pulpa, Knochen gut.

III. Knochen Neigung zur Sklerosierung. Leichte Hyperzementose. Odontoblasten und Ameloblasten nicht systematisch verändert.

IV. Nagezahn normale Entwicklung. Hyperzementose. Knochen schneidet sich schlecht. Stärkere Verkalkung?

[4] Roholm, K.: In Heffter-Heubners Handbuch, Ergänzungsw. Bd. 7, 1938 und O. Eichler, Heffter-Heubners Handbuch, Ergänzungsw. Bd. 10 (im Druck).

VI. Nagezahn leichte Hyperämie. Molaren reichlich Dentikel.

VII. Pulpa des Nagezahns gelegentlich hyperämisch. Einmal nach 161 Dosen schlecht verkalktes Prädentin. Die Odontoblasten der Wurzelpulpa bei diesem Tier atrophisch, meist kein wesentlicher krankhafter Befund. Die Knochenbildung ist besonders kräftig.

Diese dürftigen Angaben zeigen, daß abgesehen vom Fluortyrosin [1, 2] keine der von uns untersuchten Substanzen irgendeine Ähnlichkeit mit der Wirkung des anorganischen Fluorides zeigt. Das ist um so erstaunlicher, als unter unseren Körpern sich 2 — die Nummern VI und VII, wie wir in nächster Mitteilung belegen werden — befinden, die speziell die alkalische Knochenphosphatase zu hemmen vermögen, während weder anorganisches Fluorid noch Fluortyrosin dazu in der Lage sind. Dieser Befund stärkt noch die vielfachen Hinweise, daß durch Lähmung der Phosphatasen in vitro noch nicht eine Beeinflussung des Knochens folgt. Dazu spielen Konzentration und Verteilung der zur Vergiftung benutzten chemischen Körper eine zu große Rolle, außerdem wird die lokale Azidität von Bedeutung sein.

Allgemeine Histologie.*

Färbungsmethoden: Meist Hämatoxylin-Eosin und Sudanfärbung, seltener Azan- und Eisenfärbung. Die Schilddrüsen wurden in Serien geschnitten. Neben den oben aufgeführten Substanzen wird hier auch über die Präparate berichtet, die aus früheren Versuchen von Euler und Eichler [1, 2] zur Aufarbeitung zurückgeblieben waren. Zur Untersuchung kamen Lunge, Herz, Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Schilddrüse und Epithelkörperchen. Wir werden unsere Beobachtungen vergleichend nach einzelnen Organen hier niederlegen. Gleich ausschalten dürfen wir Herz, Lunge und Milz, die keine Anhaltspunkte boten.

Die Leber.

Bei NaF wurden meist Nekroseherde gefunden mit Leukozyteninfiltration, vielfach auch Verfettung, und zwar ohne rechte Beziehung zur Dosierung von über 5 mg/kg an. Solche Nekrosen sind bei den höheren Dosen von *Fluortyrosin* auch zu sehen, bei den höchsten Dosen (20 mg/kg) ist eine Verfettung namentlich in der Peripherie der Läppchen üblich. Diese nimmt ab bei 5 und 10 mg/kg. Dort findet man aber noch eine vakuoläre Protoplasmaveränderung. Bei noch niederen Dosen findet sich ein aufgelockertes Protoplasma, wie es für einen

* Bei der letzten Beurteilung der Präparate verdanken wir Herrn Doz. Dr. Eger Rat und Hilfe.

starken Glykogengehalt charakteristisch ist, und wie es auch von Litzka[5] beschrieben wurde.

Bei *Präparat I* fand sich bei den hohen Dosen eine Vakuolenbildung, wie sie von Büchner bei Anoxämie beschrieben wurde. Es handelt sich nicht um Verfettung. Bei 10 mg/kg fand sich auch hier ein höherer Glykogengehalt ohne sonstige anatomischen Veränderungen. Dieselben Befunde wiederholten sich bei *Präparat II*. Eine geringere Giftwirkung zeigte sich hier darin, daß bei 20 mg/kg nur einmal (von 5 Tieren) Vakuolen entstanden. Bei *Präparat III* wurde nicht immer Glykogenanhäufung, aber auch keine toxische Schädigung gefunden. Der Glykogengehalt war am stärksten und konstantesten bei *Präparat IV*. Nur bei einem Tier waren einige herdförmige Nekrosen zu sehen. Nach *Präparat VI* war die Leber nur mit Vakuolen besetzt. Ebenso bei *Präparat VII*. Bei diesem wurde einmal Andeutung von Glykogen gefunden, nie Verfettungen.

Zusammenfassend sieht man, daß bei den fluorhaltigen Substanzen die Wirkung auf das Leberglykogen gemeinsam ist, aber verschieden stark ausgeprägt. Beim anorganischen Fluorid trat es in unseren Versuchen nur bei einem von 66 Tieren nach 15 mg/kg NaF in Erscheinung. Die anderen Produkte unterschieden sich in dem Nebeneinander von Verfettung, vakuoliger Degeneration und Nekrosen. Die stärkste Glykogenspeicherung, die noch mit chemischen Methoden zu prüfen sein wird, fand sich bei Präparat IV. Bei der Dosierung ist zu beachten, daß alle im Verhältnis zur akuten Toxizität auf dem gleichen Niveau liegen. Nur bei Fluortyrosin und NaF kamen auch niedere Dosen zur Verwendung. Beide sind also gegenüber der Leber toxischer, ihnen folgend sind zu nennen: Präparat I und VII und VI.

Die Niere.

Beim anorganischen Fluorid sind die Veränderungen bekannt. Wir führen unsere Befunde kurz an, da wir alle Tiere unter derselben Diät hatten. Verfettungen sahen wir selten, dagegen ganz gewöhnlich homogene und fädige Eiweißablagerungen und Zylinder in den Lumen der Tubuli. Deren Epithelien waren verquollen, schollig vakuolär aufgelockert, gelegentlich interstitielle Leukozytenanhäufungen. Bei *Fluortyrosin* war die Nierenschädigung in derselben Art noch ausgesprochener z. B. im Sinne einer Nephrose, und zwar auch bei den niedrigen Dosierungen von 2 mg/kg, hierin also eine Diskrepanz gegenüber der Leber. Dasselbe kann man von *Präparat I* sagen, und zwar mehr abhängig von der Dauer der Dosierung als von der Dosis. Ebenso bei *Präparat II*. Dagegen waren die Nieren von *Präparat III* völlig frei, bei *Präparat IV*

[5] Litzka, G.: Arch. exper. Path. (D.) 183, 427, 436 (1936). — Z. exper. Med. 99, 518 (1936).

fanden sich nur gelegentlich Eiweißablagerungen, keine Schädigung der Epithelien. Bei Präparat VI wurden wieder nephrotische Veränderungen deutlich, besonders auch bei Präparat VII, bei dem auch die Epithelien schollig vakuoläre Struktur zeigten. Einmal fanden sich Kalkablagerungen, einmal Narben in der Rinde.

Zusammenfassend zeigt sich eine große Ähnlichkeit von Fluortyrosin mit Präparat I und II, wie man es nach der Struktur erwarten kann. Denn Präparat I ist aus Fluortyrosin durch zusätzliche Einfügung von einem Bromatom, Präparat II von einem Jodatom entstanden. Der erste Schritt, die Einfügung des Fluors in das körpereigene Tyrosin, führt zur Veränderung. Das gilt auch von Präparat VI, da das Albuzid ohne Fluor harmlos ist. Über Phthiocol liegen — wegen Mangel an Material — keine vergleichenden Untersuchungen vor. Die Produkte III und IV mit ihrem vorwiegend basischen Charakter heben sich aus den anderen gerade in der Wirkung auf die Niere heraus.

Die Schilddrüse.

Dieses Organ interessierte uns vor allem wegen der behaupteten Wirkung der Fluoride bei Basedow. Eine Beurteilung ist hier besonders durch rasch einsetzende autolytische Vorgänge erschwert, so daß fast nur getötete Tiere zum Vergleich herangezogen werden können.

Wägungen wurden nicht ausgeführt. Das histologische Bild kann nur über die Dicke des Epithels, den Kolloidreichtum und vielleicht die Bindegewebswucherung Auskunft geben. Bei allen Präparaten wurde das Epithel kubisch gefunden, bei NaF mit Neigung zur Proliferation. Nur bei Präparat II waren häufiger auch flache Epithelien zu sehen. Kolloid war meist nicht zu finden außer bei Präparat II. Bei Fluortyrosin war der Befund bei 2 mg/kg wechselnd. Einmal fand sich hier vermehrtes Bindegewebe. Insgesamt ergeben sich also eher Anzeichen erhöhter als verminderter Aktivität. Das würde in gewissem Sinne mit den Versuchen von Phillips und Lamb[6] übereinstimmen, die nach NaF eine geringe Zunahme des Parenchyms sahen. In der hier verwandten Dosierung macht nur das jodhaltige Präparat II darin eine Ausnahme.

Nebenschilddrüsen.

Da diese Drüsen mit den Verkalkungsvorgängen zusammenhängen und die Wirkung der chronischen Darreichung von NaF in dieser Richtung liegt, hat man schon häufig nach sichtbaren Veränderungen gesucht. Die genauesten Untersuchungen mit Messungen lagen von Hauck, Steenbock und Parsons[7] vor, die eine Verkleinerung auf-

[6] Phillips, P. H. and A. R. Lamb: Arch. Path. (Am.) **17**, 169 (1934). — [7] Hauck, H. M., H. Steenbock and H. T. Parsons: Amer. J. Physiol. **103**, 480, 489 (1933).

fanden bei manchen Diäten mit gelegentlicher fettiger Degeneration und Nekrosen. Solche Beobachtungen konnten wir nie sehen. Allerdings waren unsere Dosen von NaF kleiner als die der obigen Autoren. Anfangs glaubten wir eine Zunahme der Größe der Drüsen zu sehen. Das ließ sich nicht verfolgen, weil uns zu wenig Serienschnitte vorlagen. Wir fanden gewisse Unterschiede in der Zahl der sogenannten hellen Zellen, deren Zunahme auf eine erhöhte Aktivität der Drüse hindeuten könnte. Deren Überwiegen fand sich bei Na-Fluorid, Fluortyrosin, sowie Präparat VI und VII, absolut regelmäßig. Bei Präparat I und II dagegen (trotz der chemischen Ähnlichkeit) meist ein Überwiegen der dunklen Zellen. Die Präparate III und IV standen mit wechselnden Befunden in der Mitte. Wir möchten betonen, daß nur gestützt auf weitere funktionelle Untersuchungen diese Befunde einen Sinn erhalten können. Bis dahin stellen sie nur Hinweise dar.

Die Nebennieren.

Nach NaF fanden Phillips und Chang[8] eine Zunahme des Gewichtes, aber keine histologischen Veränderungen. Wir legen gerade auf die Histologie größten Wert, da wir durch die Befunde von Eger[9] in dem Verhalten und der Verteilung der Lipoide in der Nebennierenrinde einen Hinweis auf das Verhalten des Kreislaufs erhalten, d. h. ob die Regulationen durch die immer wiederholten Vergiftungen angespannt werden oder nicht (s. dazu Barfuss und Eichler[1]). So fanden wir meist nach anorganischem Fluorid eine Armut an Lipoiden mit großen Vakuolen in der Rinde. Bei den größeren Dosen werden sicher die Regulationen angespannt werden müssen, um die bei höheren akuten Gaben hervortretende Tendenz zur Blutdrucksenkung zu überwinden. Verarmung an Lipoiden fand sich auch bei 2 mg Fluortyrosin ohne Vakuolen. Bei *Präparat I* war nur zweimal ein ähnliches Bild zu sehen, meist fand sich das Lipoid gleichmäßig über die ganze Rinde verteilt, auch in der Retikularis (gelegentlich Vakuolen am Übergang zur Fasciculata). Bei Präparat II war wieder das Bild wie nach Fluortyrosin, ebenso Präparat III und VII. Präparat VI zeigte Lipoidreichtum in der Retikularis, jedoch auch Vakuolenbildung in der Fasciculata. Völlig hoben sich die Nebennieren nach Präparat IV, dem fluorierten Veritol, heraus. Die Rinde war reich an Lipoiden in allen drei Schichten, keine Vakuolen. Die Beziehung zur Regulation des Kreislaufs zeigt sich in der stark blutreichen Milz. Wir fassen also die Veränderungen in den Nebennieren ausschließlich passiv bedingt auf.

[8] Phillips, P. H. and Ch. Y. Chang: J. biol. Chem. (Am.) **105**, 405 (1934).
[9] Eger, W.: Verh. dtsch. path. Ges. **1937**. — Virchows Arch. **309**, 811 (1942). —
[10] Barfuss, F. und O. Eichler: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck).

Die Wirkung auf die Nebennierenhistologie weicht beträchtlich von den Befunden an den anderen Organen ab, indem hier Präparat VI und vielleicht Präparat I neben Präparat IV als unschädlich anzusehen sind. Im Zahnsystem fanden wir bei Präparat I, II, VI, VII eine Hyperämie angegeben. Dieser Befund deckt sich also nicht mit den zu vermutenden Kreislaufwirkungen nach den Befunden an der Nebennierenrinde. Wie hier eine Kreislaufwirkung des Veritols hineingespielt, ist nicht zu entscheiden. Aber in Präparat III, dem Fluortyramin, liegt ja auch ein Derivat eines auf den Kreislauf wirksamen Körpers vor, wenn diese Wirkung auch geringfügiger ist.

Diskussion und Zusammenfassung.

Von den hier untersuchten Substanzen ist bei chronischer Darreichung ein fluoriertes Veritol am wenigsten schädlich. Dann folgt Fluortyramin, obwohl dieses nach der Nebennierenhistologie eine gewisse Beeinflussung des Kreislaufs vermuten läßt. Beide wirken kaum auf die Niere und Leber. Bei letzterem ist sogar die Tendenz zur Speicherung von Glykogen deutlich. Diese Tendenz findet sich bei anorganischem Fluorid sehr selten, bei Fluortyrosin bei niederen Dosen, allerdings rasch übergehend zur Verfettung und Vakuolisierung, begleitet auch noch in niederen Dosen von Störungen der Niere. Einfügung von Brom und Jod in diese Moleküle verändert die Nierenschädlichkeit des Fluortyrosins nicht. Eine fluoriertem Prontalbin ähnliche Verbindung und Fluorphthiocol schließen sich auch diesen Substanzen an.

Histologische Befunde an Nebenniere, Schilddrüse und Nebenschilddrüse werden mitgeteilt.

Am Zahnsystem der Ratte finden sich bei keiner der hier untersuchten Substanzen irgendwelche besonders in das Auge fallende, an Fluor erinnernde Veränderungen, abgesehen von der vermuteten Tendenz zu stärkerer Verkalkung bei Fluortyramin und Fluorveritol.

Aus dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der früheren Universität Breslau (Direktor: Prof. Dr. Eichler).

Wirkung einiger organischer Fluoride auf Hefegärung und Phosphatase.

Von

O. Eichler, H. Hindemith und F. Barfuss †.

(Eingegangen am 2. April 1948.)

Die hier mitgeteilten Versuche schließen sich an die vorhergehende Arbeit[1] an. Die dort am ganzen Tier verwandten Substanzen wurden hier an Hefe und Phosphatasen geprüft. Das hatte nicht nur ein Interesse, weil das anorganische Fluorid als ein ganz spezielles und vielseitiges Fermentgift bekannt ist. Es erhebt sich so die Frage, inwieweit diese Eigenschaft in organischer Bindung erhalten bleibt, wie es hinsichtlich des Knochen- und Zahnsystems mit Fluortyrosin gefunden wurde[2]. Dazu kommt anschließend an diese Versuche jetzt noch das Problem, ob gerade die Phosphatasen gehemmt werden, da diesen Fermenten eine besondere Funktion in der Verknöcherung zugeschrieben wird.

Versuche mit Hefe.

Die Versuche erfolgten im Warburgschen Apparat [3]. Im Ansatz befanden sich 2 cm³ 5% Glukose und 0,2% KH_2PO_4. Dazu wurden 0,4 cm³ Hefesuspension gefügt der Stärke 1 g auf 60 cm³ H_2O. Die Konzentrationen der zugesetzten Substanzen wurden so hoch gesteigert, wie die Löslichkeit es zuließ, teilweise bis 0,02 molar. Geschüttelt wurde bei 37°. Bei jedem Ansatz wurden nebeneinander nicht nur zwei Suspensionen ohne zugesetzte Substanz geprüft, sondern auch zwei Ansätze mit anorganischem Fluorid in geeigneter Konzentration. Auch Fluortyrosin wurde in die Untersuchung einbezogen und der Befund von Litzka über seine Wirkungslosigkeit bestätigt. Aber ebensowenig

[1] Euler, H., O. Eichler u. H. Hindemith: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 75 (1949) vorhergehende Publikation. — [2] Euler, H. u. O. Eichler: Literatur s. vorhergehende Arbeit.

[3] Dem Roche-Fonds der deutschen Forschungsgemeinschaft verdanken wir die Anschaffung dieser Apparatur.

gelang es mit irgendeiner der anderen geprüften Substanzen irgendeinen Effekt zu erreichen. Die Wiedergabe der Protokolle ersparen wir uns.

Versuche mit Phosphatase.

Wir prüften saure und alkalische Phosphatase. Als saure Phosphatase wählten wir die Blutphosphatase, die wir nach Bamann (Methodik der Fermentforschung Bd. II, S. 1638) gewannen.

Ein Teil Kaninchenblutkörperchen und drei Teile destilliertes Wasser blieben 15 Min. stehen. Dann wurde nochmals 1 : 50 verdünnt und von diesem Hämolysat 5 $cm^3 = 0{,}1$ g Erythrozyten entnommen. Sehr wichtig ist eine vorherige Filtration, da Niederschläge auch Phosphatase enthalten und so ganz unregelmäßige Werte entstehen können, je nachdem ein Bodensatz aufgewirbelt wird. Als Puffer diente ein Zitratpuffer von p_H 5,5. Die Azidität wurde mit der Hydrochinonelektrode geprüft.

Der Ansatz bestand aus 2,0 cm^3 4,1% Na-β-Glyzerophosphat, 1 oder 2 cm^3 Puffer, 10 cm^3 Blutphosphatase, Aqua dest. ad 25,0. In diesem wurden die verschiedenen Substanzen gelöst. Die Mischung wurde im Thermostaten bei 30° gelassen. Je 10 cm^3 wurden nach 1 und 2 Stunden entnommen, sofort das gleiche Volumen 8% Trichloressigsäure zugesetzt und nach Subarow und Fiske nach den Angaben von Lohmann im photoelektrischen Kolorimeter von Havemann kolorimetriert. Die Konzentrationen der zugesetzten Substanzen wurden bis 0,01 molar gesteigert. Niemals gelang es eine Hemmungswirkung zu erzielen.

Besonders erwähnen wir das Fluorphthiocol. Dieses ist in saurer Lösung schwer löslich und gefärbt. Wenn man durch Kompensation die gelbe Grundfarbe berücksichtigt, ergibt sich auch unter diesen Bedingungen völlige Wirkungslosigkeit.

Die *Knochenphosphatase* gewannen wir nach Bamann (Methodik der Fermentforschung Bd. II, S. 1659) einmal aus den Röhrenknochen eines Kaninchens, einmal aus denen einer Katze.

Als Puffer verwandten wir einmal den dort vorgeschriebenen NH_4Cl-NH_3-Puffer. Da jedoch die Möglichkeit einer chemischen Umsetzung mit Phthiocol besteht, wurden die Versuche mit Veronalpuffer von Michaelis wiederholt. Das p_H betrug bei dem ersten Versuch 8,5, bei dem zweiten 9,0 und wurde vor und am Ende des Versuchs mit der Glaselektrode kontrolliert. Der sonstige Ansatz und das weitere Verfahren entsprach dem bei der sauren Phosphatase.

Völlig ohne Wirkung blieben bis 0,01 molar die Präparate I, III, V und Fluortyrosin. Von den anderen geben wir die Unterlagen in drei kurzen Protokollen, bei denen wir gleich die Hemmungen angeben ohne die absoluten Zahlen, die keine Rolle spielen.

Präparat II (Jodfluortyrosin).

Molare Konzentration	0,00125	0,0025	0,005	0,01	0,015
Hemmung in %	0	0	8	20	21

Eine Hemmung ist also vorhanden, führt aber nicht weit trotz hoher Konzentration.

Präparat VI (Fluorprontalbin).

Molare Konzentration	0,0003—0,00125	0,0025	0,005	0,01
Hemmung in %	0	16	26	51

Die Hemmung ist stärker als bei dem vorigen Präparat. Sie wurde auch bei anderen Versuchen[1] bei alkalischer Phosphatase des Froschherzens nachgewiesen. Das nicht fluorierte Albucid (dessen Azetylgruppe nicht an der anilinartigen Aminogruppe sitzt) zeigt keine Hemmungswirkung.

Fluorphthiocol.

Molare Konzentration		0,001	0,005	0,01
Hemmung in %	Phthiocol	38	58	59
	Fluorphthiocol	25	46	48

Hier sehen wir eine bedeutende Hemmungswirkung, die sich allerdings von 0,005 auf 0,01 molar kaum mehr steigert. Die Hemmung der alkalischen Phosphatase ist sowohl dem fluorhaltigen als fluorfreien Produkt zu eigen. Hier sieht man sogar nach Einfügung des Fluoratoms eine deutliche Abnahme der Aktivität. Das geht nach der Untersuchung mit G. Meyer parallel der Stärke der Farbenentwicklung. Es handelt sich um stark gefärbte Produkte bei alkalischer Reaktion.

Die hier erwähnten, gegenüber Phosphatase aktiven Substanzen sind starke Komplexbildner. Daß Phthiocol zur Komplexbildung fähig ist, wurde kürzlich von Geyer und Smith[1] berichtet. Als Komplexbildner werden folgende Metalle genannt: $Co^{\cdot\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot}$, Mg., $Mn^{\cdot\cdot}$, $Ni^{\cdot\cdot}$, $Zn^{\cdot\cdot}$, Uranyl, also auch Mn und Mg, unter denen wir die Aktivatoren der Phosphatase zu suchen haben werden. Über die Art der Komplexe, ihre Zusammensetzung und die Bedingungen ihrer Bildung bzw. die Funktion des Fluoratoms in diesen Verbindungen wird demnächst von G. Meyer berichtet werden.

---

[1] Eichler, O. u. W. Stober: Arch. exper. Path. (D.) **205**, 647 (1948). Die dort (S. 655) angegebene Formel für fluoriertes Prontalbin enthält die Acetylgruppe an falscher Stelle.

[2] Geyer, B. P. u. G. M. P. Smith: J. amer. chem. Soc. **63**, 3071 (1941). Ref. nach Chem. Zbl. **1942 II**, 34.

Zusammenfassung.

Es wird über die Wirkung von 8 fluorierten organischen Verbindungen auf Hefegärung und Phosphatase berichtet. Während Hefegärung und saure Phosphatase von keiner der geprüften Substanzen beeinflußt werden, finden sich für die herangezogene alkalische Knochenphosphatase vier verschiedene Hemmungskörper. Davon ist Jodfluortyrosin (Substanz II) nur angedeutet wirksam, stärker dagegen Substanz VI (fluorierte, dem Albucid ähnliche Verbindung) und Fluorphthiocol. Etwas stärker als letzteres Phthiocol (ohne Fluor).

Die Ursache, daß NaF im sauren wirksam ist (Gärung und Phosphatase), nicht aber im alkalischen, die hier aufgefundenen Verbindungen im alkalischen, nicht aber im sauren Milieu, liegt an den Bedingungen zur Komplexbildung mit Mg und Mn, den Aktivatoren der Phosphatase.

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.

Über die Wirkung adrenalinverwandter Verbindungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel.

Von

Prof. Dr. Johann Mosonyi und Dr. Sz. Vilma Hermann.

(Eingegangen am 7. April 1948.)

Die mit den dem Adrenalin chemisch nahestehenden Verbindungen (in welchen die Aminogruppe durch andere Alkylreste und die alkoholische OH-Gruppe der Seitenkette durch eine Ketongruppe substituiert war) ausgeführten pharmakologischen Versuche führten zu dem Ergebnis, daß sie eine dem Adrenalin ähnliche Wirkung ausüben.

O. Loewi und H. Meyer [1], Dakin [2]: Dasselbe stellten Dale und Dixon [3] auch vom Tyramin und auch vom Isoamylamin fest. Diese Verbindungen wirkten jedoch viel schwächer als das Adrenalin und zeigten auch nicht jede Wirkung des letzteren. Später stellten Barger und Dale [4] noch von zahlreichen synthetischen Aminen fest, daß sie eine dem Adrenalin ähnliche „sympathikomimetische" Wirkung besitzen. Sie wiesen als erste darauf hin, daß die aromatischen Amine wesentlich wirksamer sind als die aliphatischen, ferner, daß die Wirksamkeit der ersteren auch von der Zahl der phenolischen OH-Gruppen und der Anwesenheit der alkoholischen OH-Gruppe der Seitenkette abhängt. Zwei phenolische Hydroxylgruppen besitzende Amine üben eine stärkere Wirkung aus als jene, welche nur eine phenolische Hydroxylgruppe enthalten; die alkoholische OH-Gruppe jedoch verstärkt noch die Wirkung. Die Untersuchung der sympathikomimetischen Wirkung dieser Verbindungen erfolgte durch ihre auf den Blutdruck ausgeübte Wirkung.

Im Verlauf der weiteren Forschungen wurde festgestellt, daß die Wirkungsstärke der Verbindung in erster Linie von der sich in Metastellung zur Seitenkette befindlichen phenolischen OH-Gruppe der aromatischen Amine abhängt. Die eine in Parastellung befindliche Hydroxylgruppe aufweisenden Monophenolabkömmlinge wirken viel schwächer als die ersteren. Sogar die alkoholische OH-Gruppe der Seitenkette ist vom Gesichtspunkte der Wirkung wichtiger als die phenolische Hydroxylgruppe in der Parastellung. Diese Folgerungen konnten zum Teil auf Grund der Messung des Blutdruckes, zum Teil durch Untersuchungen an der Membrana nictitans (Palpebra tertia) der Katze gezogen werden (Kuschinsky [5], Tainter [5], Bacq [7]).

In unseren eigenen Versuchen trachteten wir nun, die Beobachtungen der obigen Autoren (Kuschinsky, Tainter, Bacq), bezüglich der pharmakologischen Bedeutung der phenolischen sowie der alkoholischen Hydroxylgruppe der adrenalinverwandten Verbindungen auch auf Grund ihrer Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel zum Gegenstand unserer Untersuchungen zu machen. Zu diesen unseren Versuchen verwandten wir neben dem Adrenalin das *Sympatol*,

das *Meta-Sympatol*, ferner das nur eine alkoholische OH-Gruppe aufweisende *Phenyl-äthanol-methylamin* und das *Ephedrin*. Ihre Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel beobachteten wir im Wege der quantitativen Untersuchung des *Glykogenbestandes der Leber, der quergestreiften Muskeln und des Herzens*.

Über die Wirkung der adrenalinverwandten Verbindungen sind aus dem Schrifttum folgende Angaben bekannt: EULER und LILJESTRAND [8] beobachteten nach Sympatolwirkung eine beträchtliche Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. FRANK und KRATZ [9] zufolge stieg bei an gesunden Menschen ausgeführten Untersuchungen nach Injektion von 2 cm^3 Sympatol nach 1 Stunde der Grundstoffwechsel um 30%, nach 3 cm^3 dagegen um 47%. BAUMANN [10] untersuchte an Kaninchen die am Glykogengehalt der Leber geäußerte Wirkung des Sympatols in der Weise, daß er der Traubenzucker-Kochsalzinfusion Sympatol bzw. Adrenalin hinzufügte. Sympatol verminderte den Glykogengehalt der Leber, ebenso wie Adrenalin, und im Blute verursachte es eine beträchtliche Erhöhung des Traubenzuckergehaltes. In ähnlicher Weise beobachtete auch LASCH [11] an Kaninchen Hyperglykämie nach subkutaner Injektion von 0,1 g Sympatol. Seine Untersuchungen wurden auch von EHRISMANN und MALOFF [12] bestätigt. BERTRAM [13] konnte bei Zuckerkranken die durch Insulin verursachte Blutzuckerverminderung durch peroral verabreichte 0,1—0,3 g Sympatol beheben. Daraus folgt, daß Sympatol und das Insulin einander gegenüber ebenso antagonistisch wirken wie Adrenalin und Insulin. Im Schrifttum finden wir jedoch auch solche Angaben, die gegen eine dem Adrenalin ähnliche Wirkung des Sympatols auf den Stoffwechsel sprechen. RÜHL [14] fand beim Menschen auf intravenöse Dauerinfusion von Sympatol im Blutzuckergehalt keine nennenswerte Veränderung. Auch FRANK und KRATZ [9] beobachteten nach subkutaner Injektion von 60—80 mg Sympatol am Menschen keine Hyperglykämie, allerdings stieg der Blutdruck beträchtlich. KOTTLORS und FAUST [15] fanden auf Sympatolwirkung ebenfalls keine Veränderung im Blutzuckergehalt des Menschen. EHRISMANN und MALOFF [12] stellten fest, daß das Sympatol keine Glykosurie verursacht, LASCH [11] hingegen beobachtete eine solche geringen Grades. POCZKA und STEIGERWALD [16] sahen bei komatösen und nichtkomatösen Zuckerkranken niemals eine schädliche Wirkung des Sympatols auf den Kohlenhydratstoffwechsel. BERTRAM [17] empfiehlt sogar das Sympatol zur Behandlung des diabetischen Komas. PFLUG [18] führte Versuche an Ratten und Kaninchen aus. Er stellte fest, daß, obwohl die Wirkung des Sympatols auf den Blutkreislauf der des Adrenalins sehr ähnlich ist, in bezug auf den Stoffwechsel jedoch von diesem wesentlich abweicht. Er injiziert 20 mg/kg Sympatol bzw. 0,2 mg/kg Adrenalin den Tieren subkutan. Das Sympatol vermindert das Glykogen im Muskel nur in sehr geringem Maße und erhöht den Glykogengehalt der Leber in viel geringerem Grade als das Adrenalin. Im Blut erhöht es die Menge der Milchsäure und des Traubenzuckers kaum, Glykosurie verursacht es nicht, Kreatinurie nur in sehr geringem Maße.

BRENTANOS und PFLUGS [19] an Gesunden und Diabetikern ausgeführten Versuchen zufolge erhöht das Sympatol im Gegensatz zum Adrenalin die Blutmilchsäure und den Blutzucker kaum, auch das Ansteigen des Sauerstoffverbrauchs ist sehr gering. THADDEAS und KÖHNS [20] Untersuchungen bewiesen, daß das Sympatol auf das Muskel- und Leberglykogen keinen Einfluß ausübt. Den Milchsäure- und Zuckergehalt des Blutes erhöht es kaum, Glykosurie und Kreatinurie verursacht es nicht. Während daher die Adrenalinwirkung auf den Blutkreislauf und den Stoffwechsel parallel verläuft, sind beim Sympatol die beiden Wirkungen entgegengesetzt. MERGONI und FIORANI [21] beobachteten zwar beim Menschen nach

intravenöser Injektion von 60 mg Sympatol Blutzuckererhöung, doch erreicht sie nicht den auf Adrenalin entstehenden Wert. Über die Wirkung des Metasympatols und des Phenyl-äthanol-methylamins fanden wir im Schrifttum keine Angaben, ebenso wenig über die auf den Glykogenbestand des Herzens ausgeübte Wirkung der in unseren Versuchen behandelten adrenalinverwandten Verbindungen.

Methodik.

Zu unseren Versuchen benützten wir männliche, weiße Ratten. Die Nahrung der Tiere stellten wir nach der Vorschrift von Sherman-Spohn [22] zusammen. Diese enthält: 18% Casein, 68% Stärke, 8% Butter, 4% Salzgemisch (McCollum-Simmonds [23]), 2% Lebertran, außerdem je Tier und Tag gerechnet 0,5 g Trockenhefe. Diese Materialien rührten wir mit wenig Wasser zu einem steifen Brei. Vor Beginn der Versuche hungerten die Tiere 12 Stunden, dann belasteten wir sie mittels Magensonde mit 0,5 g Traubenzucker je 100 g Körpergewicht (2 cm^3 25%iger Traubenzuckerlösung je 100 g Körpergewicht). Zu einem Versuche verwandten wir 4 Ratten von annähernd gleichem Gewicht. Von diesen dienten zwei als Kontrollen. 3 Stunden nach der Belastung injizierten wir den zu untersuchenden Stoff subkutan, — den Kontrolltieren die gleiche Menge Ringerlösung — und töteten die Tiere 4 Stunden nach der Injektion. Wir schnitten den Kopf mit einem Scherenschlag ab und präparierten nach Ausblutung die entsprechenden Organe sofort heraus.

Die Bestimmung des *Glykogengehaltes der Leber* erfolgte mit geringer Modifikation nach Pflüger [24]. Die in ihrer Gänze herausgenommene Leber (4—8 g) brachten wir ohne Zerkleinerung in eine schon vorher im Wasserbad erhitzte, ungefähr ebensoviel 60%ige KOH-Lösung enthaltende Zentrifugenröhre. In der kochenden Lauge löst sich die Leber in 20—30 Min. auf. Wir können den Prozeß beschleunigen, wenn wir den Inhalt der Zentrifugenröhre von Zeit zu Zeit umschütteln. Zu der vollkommen geklärten Flüssigkeit geben wir sodann die gleiche Menge destillierten Wassers (auf jedes Gramm des Organs 1 cm^3 , dann zum Zwecke der Ausfällung des Glykogens die doppelte Menge 96%igen Alkohols und kochen das Ganze kurze Zeit im Wasserbad. Nach Stehenlassen durch einige Stunden zentrifugieren wir 10 Min., das sich am Boden der Röhre ansammelnde Glykogen klebt so fest, daß man die darüber befindliche Flüssigkeit einfach abgießen kann. Den Glykogenniederschlag lösen wir seiner Menge entsprechend in 5—10 cm^3 destilliertem Wasser auf, geben 1 cm^3 gesättigte NaCl-Lösung hinzu und fällen das Glykogen durch die *doppelte Menge 9 %igen Alkohols neuerlich aus.* Nach 2—3stündigem Stehenlassen wiederholen wir den Vorgang zur Reinigung des Glykogens nochmals, endlich nach der dritten Auflösung filtrieren wir die Glykogenlösung in einen Meßkolben von 50 cm^3. Nachdem wir das Filtrierpapier und die Zentrifugenröhre in heißem, destilliertem Wasser ausgewachsen haben, tröpfeln wir zur Entfernung der etwa noch vorhandenen Alkalialbuminate 1:10 verdünntes HCl zur Lösung, solange bis das eingebrachte Lakmuspapier saure Reaktion zeigt; dann füllen wir die Lösung mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf. Den ausgeschiedenen Eiweißniederschlag filtrieren wir (mit Verwendung von Filtrierpapier Schleicher und Schüll Nr. 589) und bestimmen die im Filtrat enthaltene Glykogenmenge auf polarimetrischem Wege. Die spezifische Drehungsfähigkeit des Glykogens beträgt 196,57°. Unsere Bestimmungen führten wir mit Hilfe eines Lippichschen Halbschattenapparates aus, auf welchem bereits 0,010° genau abgelesen werden können.

Zur Bestimmung des *Glykogengehaltes der Muskeln* verarbeiteten wir sämtliche Muskeln der beiden hinteren Extremitäten. Die Präparation erfolgt in der Weise, daß wir die Haut in der Mitte des Bauches mit einer Schere durchschneiden

und ganz bis zum oberen Sprunggelenk abziehen. Dann schneiden wir beide Beine in diesem Gelenk ab. Auch der Schwanz wird an der Wurzel abgeschnitten. Nach Entfernung der Organe der Bauchhöhle durchschneiden wir die Wirbelsäule mit einem durch die Inscriptio tendinea des M. longissimus dorsi (genau in Höhe der Crista iliaca) gehenden Schnitt. Beim Präparieren haben wir nur einen Muskel, den sich an der ventralen Seite der Wirbelsäule hinziehenden M. psoas durchschnitten, während die Muskeln der hinteren Extremitäten in unverletztem Zustande zur Aufarbeitung gelangen. Dieser Umstand sowie die möglichst rasche Ausführung der Präparation ist zur Verhinderung der Glykogenolyse von sehr großer Bedeutung.

Die Bestimmung des Muskelglykogens geschieht nach dem PFLÜGERschen Verfahren. Die beiden hinteren Extremitäten bringen wir in 25 cm³ heiße Kalilauge, in eine dickwandige, aus Jenaer Glas gefertigte Zentrifugenröhre von 100 cm³ und kochen sie im Wasserbad durch ungefähr 20—25 Min. unter mehrmaligem Schütteln. Wenn die Lösung vollkommen klar ist, gießen wir sie von dem abgesetzten Knochen ab, doch geteilt in zwei ebenso große Zentrifugenröhren. Die frühere Zentrifugenröhre waschen wir mit 25 cm³ destilliertem Wasser aus und gießen das Waschwasser ebenfalls in 2 Teilen zur alkalischen Glykogenlösung. Zum Ausfällen des Glykogens bringen wir dann in jede Röhre 50 cm³ 96%igen Alkohol, kochen die Lösung kurze Zeit und lassen sie dann bis zum nächsten Tage stehen. Die weitere Reinigung erfolgte, wie oben beschrieben.

Den Glykogengehalt des Herzens bestimmten wir mit Rücksicht auf seine geringe Quantität nicht auf polarimetrischem Wege, sondern in Form von Traubenzucker nach dem Verfahren von GOOD, KRAMER und SOMOGYI [25]: In eine mit eingeschliffenem Glasstöpsel versehene Zentrifugenröhre (von ungefähr 20 cm³ Rauminhalt) messen wir 2 cm³ 30%iges KOH ab und stellen sie ins kochende Wasserbad. Das Herz (0,5—1,0 g) gelangt nach Entfernung des Blutgerinnsels sofort in die kochende Lauge; nach 15—20 Min. langem Kochen ist es vollkommen gelöst. Hierauf fällen wir das Glykogen mit ungefähr 5 cm³ 96%igem Alkohol aus und bringen die Röhren neuerlich ins kochende Wasserbad, bis ihr Inhalt gerade aufkocht, dann, nach dem Abkühlen zentrifugieren wir den Niederschlag ab. Nach dem Zentrifugieren gießen wir die darüber befindliche Flüssigkeit ab, schütteln den Niederschlag mit ungefähr 5 cm³ 95%igem Alkohol und zentrifugieren neuerlich. Nach dem Abgießen der Waschflüssigkeit vertreiben wir den Restalkohol im Wasserbade. Zum Zwecke der Hydrolysierung des auf diese Weise gewonnenen Glykogens gießen wir in die Zentrifugenröhre 10 cm³ n/H_2SO_4, verschließen sie mit dem Glasstöpsel und stellen sie auf $2^1/_2$—3 Stunden ins kochende Wasserbad. Nach Beendigung der Hydrolyse neutralisieren wir die Lösung mit NaOH und gießen sie in einen Meßkolben von 25 cm³, dann füllen wir mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf. Die Traubenzuckerbestimmung führen wir nach SHAFFER-SOMOGYI [26] aus. Von Hydrolysat pipettieren wir je 5 cm³ in Kochröhren (sie entsprechen den HAGEDORN-JENSENschen zur Blutzuckerbestimmung benützten Kochröhren), messen 5 cm³ SHAFFER-SOMOGYIsches Reagens hinzu *, verschließen sie mit Glasstöpsel oder Staniolpapier und stellen sie auf 15 Min. ins kochende Wasserbad. Nachher kühlen wir sofort im kalten Wasser, fügen 5 cm³ n/H_2SO_4 hinzu und nach 10 Min. langem Stehenlassen titrieren wir das im Überschuß befindliche Jod mit n/200 $Na_2S_2O_3$. Bei jeder einzelnen Versuchsreihe müssen natürlich auch Blindbestimmungen ausgeführt werden. Die Berechnung erfolgt in der Weise,

* Zusammensetzung des SHAFFER-SOMOGYIschen Reagens: Natrium carbonicum anhydr. 2,0 g, Natrium bicarbonicum 20,0 g, SEIGNETTE-Salz 25,0 g, Cuprum sulfuricum cryst. 7,5 g, n/10 KJO_3 50 cm³, Kalium jodatum 1,0 g, Aqua destillata ad 1000 cm³.

daß wir vom Blindwert die Zahl der Kubikzentimeter des zur Titrierung der Lösung verbrauchten Natriumthiosulfats abziehen und den Rest mit 0,113 multiplizieren: so erhalten wir die bestimmte Traubenzuckermenge in Milligramm. Diese mit 0,927 multipliziert ergibt die dem Traubenzucker entsprechende Glykogenmenge. Da wir zu einer Bestimmung nur $^1/_5$ des Hydrolysats verbrauchten, beträgt der Glykogengehalt des Herzens das Fünffache.

Die absoluten Glykogenwerte der auf diese Weise untersuchten Organe rechnen wir auf 100 g des unmittelbar vor der Zuckerbelastung ermittelten Körpergewichtes der Ratten um. Wenn z. B. der Glykogengehalt der beiden hinteren Extremitäten einer 210 g schweren Ratte 92 mg beträgt, dann fallen auf 100 g Körpergewicht 44 mg Glykogen.

Bei der Tötung der Tiere, also 4 Stunden nach Injektion des zu untersuchenden Stoffes führten wir in mehreren Fällen auch Blutzuckerbestimmungen aus. Da jedoch das Blutzuckerniveau sich als vollkommen normal erwies, sahen wir in der Folge von Blutzuckeruntersuchungen ab.

Versuchsergebnisse.

Unsere Versuchsergebnisse zeigen die folgenden Tabellen 1—7.

Wie aus den Untersuchungen von Cori und Cori [27] hervorgeht, beeinflußt *Adrenalin* den Kohlenhydratstoffwechsel in eigentümlicher Weise. Schon nach subkutaner Injektion einer sehr kleinen Menge Adrenalin werden vor allem die

Tabelle 1. *Absoluter Glykogengehalt der Leber, der Muskulatur der beiden Hinterschenkel und des Herzmuskels in Milligramm, reduziert auf 100 g Körpergewicht, nach Verabreichung von 0,02 mg/100 g Adrenalin.*

Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Verabreichung des Adrenalins getötet.

Datum	Nr. des Tieres	Körpergewicht in g	Bemerkungen	Glykogengehalt in mg/100 g		
				Leber	Muskel	Herz
II. 26	19	225	Kontrolle	45	29	0,36
	20	227	„	20	46	0,49
			Mittelwert	33	38	0,43
	17	220	nach Adrenalin	57	18	0,40
	18	220	„ „	72	2	0,47
			Mittelwert	62	10	0,44
IV. 13	47	112	Kontrolle	0	13	1,18
	48	118	„	13	34	1,21
			Mittelwert	7	24	1,20
	45	125	nach Adrenalin	12	6	0,73
	46	125	„ „	16	4	0,73
			Mittelwert	14	5	0,73
VI. 30	99	175	Kontrolle	54	35	0,28
	100	173	„	43	36	0,36
			Mittelwert	49	36	0,32
	97	185	nach Adrenalin	167	11	0,76
	98	178	„ „	154	12	0,78
			Mittelwert	161	12	0,82

Tabelle 2. *Absoluter Glykogengehalt der Leber, der Muskulatur der beiden Hinterschenkel und des Herzmuskels in Milligramm, reduziert auf 100 g Körpergewicht, nach Verabreichung von 2 mg/100 g Sympatol.*

Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Verabreichung des Sympatols getötet.

Datum	Nr. des Tieres	Körpergewicht in g	Bemerkungen	Glykogengehalt in mg/100 g		
				Leber	Muskel	Herz
IV. 9	43	120	Kontrolle	26	7	0,94
	44	120	„	19	8	1,11
			Mittelwert	23	8	1,03
	41	120	nach Sympatol	43	12	1,25
	42	120	„ „	23	12	0,83
			Mittelwert	33	12	1,04
VI. 17	91	185	Kontrolle	6	26	0,58
	92	150	„	5	27	0,91
			Mittelwert	6	27	0,75
	89	160	nach Sympatol	19	39	0,73
	90	165	„ „	8	16	0,45
			Mittelwert	14	28	0,59
VI. 21	95	205	Kontrolle	4	31	0,56
	96	198	„	4	32	0,69
			Mittelwert	4	32	0,63
	93	185	nach Sympatol	8	35	0,94
	94	185	„ „	12	35	0,49
			Mittelwert	15	35	0,72
VII. 2	103	223	Kontrolle	70	46	0,39
	104	155	„	85	44	0,14
			Mittelwert	78	45	0,27
	101	182	nach Sympatol	115	59	0,55
	102	175	„ „	102	38	0,36
			Mittelwert	109	49	0,46

Glykogendepots mobilisiert: der Glykogenbestand der Leber, wie auch der quergestreiften Muskeln nimmt beträchtlich ab. In Verbindung mit der Glykogenolyse tritt eine 2—4 Stunden dauernde Hyperglykämie und eventuell auch eine sich hinzugesellende Glykosurie auf. Der aus dem Muskelglykogen abgespaltene Traubenzucker wird noch weiter zu Milchsäure abgebaut, diese jedoch gelangt mit dem Blute in die Leber und wird hier wiederum zu Traubenzucker aufgebaut, ein Teil hiervon in Glykogen verwandelt und in der Leber aufgespeichert; der größere Teil gelangt ins Blut und wird eventuell mit dem Harn ausgeschieden. Deshalb findet man nach dem Abklingen der Adrenalinwirkung mehr Glykogen in der Leber als vor Verabfolgung des Adrenalins, dagegen verschwindet der Glykogenbestand der Muskeln sozusagen vollständig.

Bezüglich der vom Adrenalin auf den Glykogenbestand des Herzens ausgeübten Wirkung finden wir im Schrifttum nur wenige Angaben. HAENDEL und MUNILLA [28] beobachteten an Hunden die Abnahme des Herzglykogens, LAWRENCE und MCCANCE [29], LONG und EVANS [30], sowie EVANS [31] an Ratten aus-

Tabelle 3. *Absoluter Glykogengehalt der Leber, der Muskulatur der beiden Hinterschenkel und des Herzmuskels in Milligramm, reduziert auf 100 g Körpergewicht, nach Verabreichung von 4 mg/100 g Sympatol.*

Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Verabreichung von Sympatol getötet.

Datum	Nr. des Tieres	Körpergewicht in g	Bemerkungen	Glykogengehalt in mg/100 g		
				Leber	Muskel	Herz
XI. 3	147	225	Kontrolle	50	43	0,28
	148	230	„	57	43	0,20
			Mittelwert	54	43	0,24
	145	220	nach Sympatol	148	52	0,55
	146	220	„ „	104	41	0,35
			Mittelwert	126	47	0,45
XI. 5.	151	210	Kontrolle	30	53	0,32
	152	223	„	46	52	0,35
			Mittelwert	38	53	0,34
	149	200	nach Sympatol	73	45	0,62
	150	195	„ „	31	48	0,45
			Mittelwert	52	47	0,54
XI. 9.	155	205	Kontrolle	7	31	0,07
	156	225	„	53	46	0,22
			Mittelwert	30	39	0,15
	153	225	nach Sympatol	23	29	0,21
	154	225	„ „	68	35	0,49
			Mittelwert	46	32	0,35

geführten Untersuchungen zufolge verändert sich auf Adrenalinwirkung der Glykogenbestand des Herzens nicht. Chang [32] wies nach, daß große Adrenalindosen den Glykogengehalt des Rattenherzens vermindern, 1 Stunde nach der Injektion jedoch erhebt sich das Glykogen wieder auf den Normalwert. Liebig [33] injiziert 1,0—1,5 mg/kg Adrenalin Kaninchen subcutan; kurze Zeit nach der Injektion sinkt der Glykogengehalt des Herzens, doch nach ungefähr 3 Stunden wird er wieder normal.

Unsere eigenen Versuche mit Adrenalin (s. Tabelle 1) stimmen mit den Angaben des Schrifttums vollkommen überein. Dies gilt auch für das Herzglykogen, da wir die Tiere 4 Stundeu nach der Adrenalininjektion töteten, wo der Glykogenbestand des Herzmuskels — den oben angeführten Autoren zufolge — bereits wieder normalen Wert zeigt.

Das Sympatol (s. Tabelle 2 und 3) ruft im Verhältnis zu den entsprechenden Werten der Kontrolltiere in der Leber eine beträchtliche Glykogenvermehrung hervor, und zwar nach Verabfolgung von 2 mg/100 g durchschnittlich von 59% und nach 4 mg/100 g 83%. Dagegen beeinflußt das Sympatol den Glykogenbestand der Muskeln der hinteren Extremitäten nicht. Interessant ist jedoch seine auf den

Tabelle 4. *Absoluter Glykogengehalt der Leber, der Muskulatur der beiden Hinterschenkel und des Herzmuskels in Milligramm, reduziert auf 100 g Körpergewicht, nach Verabreichung von 2 mg/100 g Metasympatol.*

Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Verabreichung von Metasympatol getötet.

Datum	Nr. des Tieres	Körpergewicht in g	Bemerkungen	Glykogengehalt in mg/100g		
				Leber	Muskel	Herz
IX. 21.	115	168	Kontrolle	30	38	0,32
			Mittelwert	30	38	0,32
	113	170	nach Metasympatol	6	31	0,55
	114	170	,, ,,	15	28	0,81
			Mittelwert	11	30	0,68
IX. 24.	119	185	Kontrolle	14	36	0,54
	120	175	,,	5	30	0,61
			Mittelwert	10	33	0,58
	117	180	nach Metasympatol	4	17	0,85
	118	180	,, ,,	4	14	0,93
			Mittelwert	4	16	0,89
IX. 29.	123	193	Kontrolle	31	39	0,30
	124	183	,,	53	41	0,32
			Mittelwert	42	10	0,31
	121	200	nach Metasympatol	5	25	0,46
	122	195	,, ,,	9	39	0,57
			Mittelwert	7	32	0,52
X. 4.	127	182	Kontrolle	17	46	0,19
	128	200	,,	33	50	0,43
			Mittelwert	25	48	0,31
	125	178	nach Metasympatol	5	29	0,25
	126	178	,, ,,	33	29	0,38
				19	29	0,32
XI. 11.	159	205	Kontrolle	6	31	0,26
	160	222	,,	31	34	0,19
			Mittelwert	19	33	0,23
	157	213	nach Metasympatol	6	24	0,50
	158	215	,, ,,	19	37	0,56
			Mittelwert	13	31	0,53
XI. 16.	163	232	Kontrolle	30	31	0,27
	164	225	,,	36	31	0,24
			Mittelwert	33	31	0,26
	161	245	nach Metasympatol	25	27	0,45
	162	245	,, ,,	5	30	0,33
			Mittelwert	15	29	0,39
XI. 18.	167	240	Kontrolle	19	31	0,20
	168	265	,,	32	31	0,14
			Mittelwert	26	31	0,17
	165	230	nach Metasympatol	7	30	0,66
	166	225	,, ,,	4	37	0,34
			Mittelwert	6	34	0,50

Tabelle 5. *Absoluter Glykogengehalt der Leber, der Muskulatur der beiden Hinterschenkel und des Herzmuskels in Milligramm, reduziert auf 100 g Körpergewicht, nach Verabreichung von 4 mg/100 g Phenyl-äthanol-methylamin.*

Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Verabreichung von Phenyl-äthanol-methylamin getötet.

Datum	Nr. des Tieres	Körpergewicht in g	Bemerkungen	Glykogengehalt in mg/100g		
				Leber	Muskel	Herz
I. 24.	223	133	Kontrolle	15	52	0,38
	224	138	,,	24	35	0,54
			Mittelwert	20	44	0,46
	221	140	nach Phenyl-	14	47	0,78
	222	138	äthanol-methylamin	17	55	0,34
			Mittelwert	16	51	0,56
I. 26.	227	135	Kontrolle	19	43	0,47
	228	130	,,	12	49	0,18
			Mittelwert	16	46	0,33
	225	135	nach Phenyl-	34	43	0,73
	226	135	äthanol-methylamin	15	43	0,55
			Mittelwert	25	43	0,64
I. 28.	231	123	Kontrolle	33	57	0,48
	232	125	,,	26	51	0,52
			Mittelwert	30	54	0,50
	229	125	nach Phenyl-	22	41	0,38
	230	125	äthanol-methylamin	14	71	0,50
			Mittelwert	18	56	0,44
II. 4.	239	115	Kontrolle	33	42	0,82
	240	118	,,	35	43	0,53
			Mittelwert	34	43	0,68
	237	125	nach Phenyl-	18	40	0,66
	238	125	äthanol-methylamin	20	35	0,60
			Mittelwert	19	38	0,63

Glykogengehalt des Herzmuskels ausgeübte Wirkung. In einer Dosis von 2 mg zeigt es sich unwirksam, auf Verabreichung von 4 mg/100 g jedoch erhöht es den Glykogenbestand in hohem Grade, im Mittelwert um 87%. Die mit einer Dosis von 4 mg ausgeführten Untersuchungen waren deshalb nötig, weil wir das Sympatol in dl-Form verabfolgten, dagegen stand uns das später zu behandelnde Metasympatol in l-Modefikation und als weinsteinsaures Salz zur Verfügung. Nun erscheint aber die blutdruckerhöhende Wirkung des d-Sympatols 50mal schwächer als die des l-Sympatols, 2 mg l-Sympatol werden daher ungefähr die gleiche Wirkung haben wie 4 mg dl-Sympatol.

Die Wirkung des l-Metasympatols * (s. Tabelle 4) stimmt mit der des Sympatols nur in seiner auf das Herzmuskelglykogen ausgeübten

* Wir verwandten es als salzsaures Salz.

Tabelle 6. *Absoluter Glykogengehalt der Leber, der Muskulatur der beiden Hinterschenkel und des Herzmuskels in Milligramm, reduziert auf 100 g Körpergewicht, nach Verabreichung von 2—10 mg/100 g Ephedrin.*

Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Verabreichung des Ephedrins getötet.

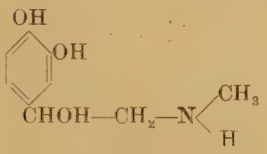
Datum	Nr. des Tieres	Körpergewicht in g	Bemerkungen	Glykogengehalt in mg-/100g		
				Leber	Muskel	Herz
X. 11.	131	198	Kontrolle	47	35	0,33
	132	178	,,	45	50	0,24
			Mittelwert	46	43	0,29
	129	208	nach Ephedrin	31	41	0,53
	130	208	,, ,,	38	49	0,16
			Mittelwert	35	45	0,35
X. 13.	135	165	Kontrolle	19	49	0,36
	136	160	,,	33	40	0,20
			Mittelwert	26	45	0,28
	133	185	nach Ephedrin	8	46	0,55
	134	185	,, ,,	8	34	0,20
			Mittelwert	8	40	0,38
X. 15.	139	160	Kontrolle	23	46	0,28
	140	160	,,	23	58	0,51
			Mittelwert	23	52	0,40
	137	162	nach Ephedrin	6	50	0,28
	138	162	,, ,,	15	38	0,42
			Mittelwert	11	44	0,35
X. 25.	143	180	Kontrolle	71	45	0,36
	144	145	,,	25	51	0,58
			Mittelwert	48	48	0,47
	141	170	nach Ephedrin	36	38	0,54
	142	170	,, ,,	15	38	0,39
			Mittelwert	26	38	0,47

erhöhenden Wirkung überein, während es den Glykogengehalt der Leber und der Muskeln der hinteren Extremitäten im Durchschnitt um 58 bzw. 22% verringert. Bei den Versuchstieren rief dieser Wirkstoff eine sehr starke Reaktion hervor, so sehr, daß bei unseren 24 Stunden dauernden Versuchen anderer Richtung mehrere Tiere nach nur einmaliger Dosierung eingingen.

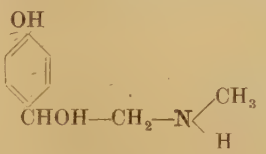
Das *Phenyl-äthanol-methylamin* wandten wir in Form seines salzsauren Salzes und seiner dl-Modifikation an *. Das Leberglykogen

* Das Phenyl-äthanol-methylamin steht bezüglich seiner Wirkungsstärke (Mydriasis, Blutdruck) dem Ephedrin sehr nahe. Bei peroraler Verabreichung ist es jedoch unwirksam. [K. K. CHEN, CHANG-KENG WU and ERLE HENRIKSEN: J. Pharmacol. a. exper. Ther. **36**, 363 (1929).]

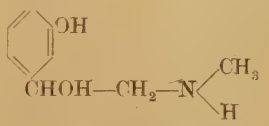
vermindert es im Durchschnitt um 24%, während es auf den Glykogengehalt der quergestreiften Muskeln überhaupt keine Wirkung ausübt; das Herzmuskelglykogen dagegen erhöht es in geringem Maße, im Mittel um 16%. Mit der Dosis von 4 mg richteten wir uns ebenfalls nach der dem racemischen Sympatol entsprechenden (s. Tabelle 5).



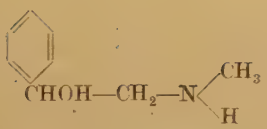
Adrenalin



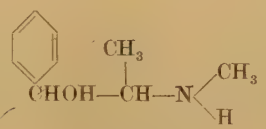
Sympatol



Metasympatol



Phenyl-äthanol-methylamin



Ephedrin

Das *Ephedrin*, das uns als Chlorhydrat der l-Modifikation zur Verfügung stand, verursacht in der Leber eine ziemlich bedeutende, durchschnittlich 44%ige, in den quergestreiften Muskeln dagegennur eine geringfügige Glykogenverminderung, während es das Herzglykogen nicht beeinflußt. Interessant ist, daß die Dosen von 2 und 10 mg in bezug auf ihre Wirkung sich als sozusagen völlig gleich stark erwiesen (s. Tabelle 6).

Besprechung der Ergebnisse.

Vor allem befassen wir uns mit der auf den Glykogenbestand der Leber und der Muskeln der hinteren Extremitäten ausgeübten Wirkung der adrenalinverwandten Verbindungen, da das Herzmuskelglykogen, wie wir dies weiter unten ausführen werden, sich den physiologischen und pharmakologischen Einwirkungen gegenüber ganz abweichend verhält (s. Tabelle 7).

In erster Linie ist es auffallend, daß unter den von uns untersuchten Verbindungen ausschließlich das eine in para-Stellung befindliche

Tabelle 7. *Zusammenfassung der Mittelwerte aus Tabelle 1—6.*

	Glykogengehalt in mg/100 g		
	Leber	Muskel	Herz
Kontrolle	29	32	0,65
0,02 mg/100 g Adrenalin	79	9	0,66
Differenz in %	+170	−72	0
Kontrolle	27	28	0,67
2 mg/100 g Sympatol	43	31	0,70
Differenz in %	+ 59	+10	+ 4
Kontrolle	41	45	0,24
4 mg/100 g Sympatol	75	42	0,45
Differenz in %	+ 83	− 7	+87
Kontrolle	26	36	0,31
2 mg/100 g Metasympatol	11	28	0,55
Differenz in %	− 58	−22	+77
Kontrolle	+ 25	+47	0,49
4 mg/100 g Phenyl-äthanol-methylamin	19	47	− 0,57
Differenz in %	− 24	0	+16
Kontrolle	36	47	0,36
2—10 mg/100 g Ephedrin	20	41	0,38
Differenz in %	− 44	−13	+ 5

OH-Gruppe besitzende *Sympatol* fähig ist, ähnlich dem Adrenalin, den *Glykogengehalt der Leber*, 4 Stunden nach Verabfolgung wie wohl in kleinerem Ausmaße *zu erhöhen*. Die anderen drei Stoffe, mit einer Hydroxylgruppe in Metastellung oder nur einer alkoholischen Hydroxylgruppe (das *Metasympatol*, das *Phenyl-äthanol-methylamin* und das *Ephedrin*) *vermindern* den Glykogengehalt der Leber; am ausgesprochensten ist die Wirkung des Metasympatols, das eine Verminderung von 58% verursachte; das Ephedrin senkte das Leberglykogen um 44%, das Phenyl-äthanol-methylamin um 24%. Den Glykogengehalt der quergestreiften Muskeln beeinflußt praktisch nur das Metasympatol; es brachte eine 22%ige Verminderung zustande.

Um die in der Einleitung aufgeworfene Frage, ob die sich auf die glatten Muskeln beziehenden pharmakologischen Beobachtungen der verschiedenen adrenalinverwandten Verbindungen auch hinsichtlich der auf den Kohlenhydratstoffwechsel ausgeübten Wirkung dieser Verbindungen bestätigt werden können, zu beantworten, müssen wir in Betracht ziehen, daß die nur eine oder gar keine phenolische OH-Gruppe besitzenden Adrenalinabkömmlinge im Organismus viel schwerer oxydiert werden, — wenigstens wird ihre protrahierte, den Blutdruck erhöhende Wirkung dadurch erklärt. Daher kann mit Recht angenommen werden, daß das Metasympatol, das Phenyl-äthanol-methylamin und das Ephedrin ihre auf das *Leberglykogen* ausgeübte vermindernde

Wirkung auch noch 4 Stunden nach ihrer Einspritzung deshalb äußern, weil sie in den Leberzellen noch vorhanden sind. Das Adrenalin dagegen wird auffallend rasch und hauptsächlich gerade in der Leber abgebaut und kommt daher nach 4 Stunden nicht mehr zur Geltung. Infolge seiner schweren Oxydierbarkeit wird sich offenbar auch das Sympatol noch in den Leberzellen befinden und wahrscheinlich auch in einer in demselben Maße verminderten Konzentration wie die anderen drei Adrenalinderivate; Glykogenolyse kann es jedoch nicht mehr zustande bringen, weil hierzu — wie wir in einer späteren Arbeit ausführen werden — eine höhere Sympatolkonzentration erforderlich wäre. Aus diesem Umstande kann wiederum gefolgert werden, daß die paralokalisierte phenolische Hydroxylgruppe vom Gesichtspunkte der Glykogenolyse aus wesentlich geringere Bedeutung besitzt, als die sich in Metastellung befindliche phenolische und die alkoholische OH-Gruppe der Seitenkette. Unter den letzteren zweierlei Hydroxylgruppen jedoch erweist sich bezüglich der von uns untersuchten Stoffwechselwirkung die in Metastellung befindliche phenolische OH-Gruppe wirksamer als die alkoholische. Hierfür spricht zugleich auch der Umstand, daß ausschließlich das Metasympatol das Muskelglykogen zu vermindern fähig ist. Aus diesen Ausführungen kann daher ersehen werden, daß die auf die OH-Gruppen der adrenalinverwandten Verbindungen bezüglichen, die die Funktion der glatten Muskulatur betreffenden pharmakologischen Gesetzmäßigkeiten auch hinsichtlich ihrer auf den Kohlenhydratstoffwechsel ausgeübten Wirkung nachgewiesen werden können. Eine weitere interessante Erscheinung ist, daß das *Sympatol* den Glykogenbestand der quergestreiften Muskeln nicht vermindert, demgegenüber aber den Glykogenbestand der Leber erhöht. Nun ergibt sich die Frage: Woher stammt dieser Kohlenhydratüberschuß? Die einzig richtige Annahme kann, unseres Erachtens, nur sein, daß auch das Sympatol, ebenso wie das Adrenalin, *Glukoneogenie*, d. h. die Umwandlung von Fett und Eiweiß in Traubenzucker auslöst. Der sich ausbildende Traubenzucker aber wird in der Form von Glykogen in der Leber aufgespeichert.

Zahlreiche Angaben des Schrifttums weisen darauf hin, daß zwischen dem Kohlenhydratstoffwechsel des Herzmuskels und der Skeletmuskulatur ein wesentlicher Unterschied besteht. Himwich [34] wies nach, daß das Herz aus dem Blut sehr wenig Kohlenhydrat aufnimmt und zum größten Teil die Milchsäure des Blutes verzehrt. Nach McGinty und Miller [35], ferner Evans [36] verbrennt das Herz 5mal soviel Milchsäure wie Glukose. Die Untersuchungen von Evans [31], Rühl [37], Vischer [38], Cruickshank [39] sowie McDonald [40] sprechen ebenfalls dafür, daß das Herz unter normalen Umständen seinen eigenen Glykogenbestand kaum verbraucht. Infolge von Hunger vermindert sich der Glykogenbestand des Herzens nicht, sondern erhöht sich eher, doch auch Zuckerbelastung steigert ihn nicht, Insulin nur dann, wenn es mit Traubenzucker zusammen verabfolgt wird.

Während unsere eigenen Versuchsergebnisse im Einklang mit dem oben angegebenen Schrifttum dafür sprechen, daß das Adrenalin 4 Stunden nach der Injektion im Glykogengehalt des Herzmuskels keine Veränderung hervorruft, bringen hingegen 4 mg/100 g Sympatol und 2 mg je 100 g Metasympatol eine beträchtliche Herzglykogenvermehrung zustande. In kleinem Maße wirkt auch Phenyl-äthanol-methylamin erhöhend auf das Herzglykogen. Bezüglich des Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen können wir vorläufig noch gar nichts sagen. Auf jeden Fall ist es interessant, daß die abweichende Wirkung des Sympatols und Metasympatols auf das Leber- und das Muskelglykogen in bezug auf den Glykogenbestand des Herzens nicht nachgewiesen werden kann.

Zusammenfassung.

Wir untersuchten die auf den Glykogenbestand von Leber, Muskeln der hinteren Extremitäten und Herzmuskel weißer Ratten ausgeübte Wirkung einiger adrenalinverwandter Verbindungen und stellten fest, daß

1. ähnlich dem Adrenalin in der Leber 4 Stunden nach der Injektion *nur das Sympatol* eine ansehnliche Glykogenvermehrung (83%) zustande bringt, und zwar ohne den Glykogengehalt der quergestreiften Muskeln zu vermindern;

2. das *Metasympatol*, das *Phenyl-äthanol-methylamin* und das *Ephedrin* unter ähnlichen Umständen das Leberglykogen vermindern; in den Muskeln der hinteren Extremitäten jedoch *nur das Metasympatol* eine geringgradige Glykogenolyse verursacht;

3. unter den OH-Gruppen der adrenalinverwandten Verbindungen hinsichtlich der auf den Kohlenhydratstoffwechsel ausgeübten Wirkung der in Metastellung befindlichen phenolischen Hydroxylgruppe eine größere Bedeutung zukommt, als der in Parastellung befindlichen, sogar die alkoholische OH-Gruppe der Seitenkette wichtiger ist als die letztere;

4. *Sympatol* und *Metasympatol* den Glykogengehalt des Herzmuskels beträchtlich, *Phenyl-äthanol-methylamin* dagegen nur in geringem Maße erhöhen.

Literatur.

[1] Loewi, O. u. H. Meyer: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **53**, 213 (1905). — [2] Dakin: Proc. roy. Soc., Lond. **76**, 498 (1905). — [3] Dale and Dixon: J. Physiol. (Brit.) **39**, 25 (1909). — [4] Barger and Dale: J. Physiol. (Brit.) **41**, 19 (1910). — [5] Kuschinsky: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **156**, 290 (1930). — [6] Tainter: Arch. internat. Pharmacodynam. **42**, 128 (1932). — [7] Bacq: Arch. internat. Pharmacodynam. **60**, 456 (1938). — [8] Euler u. Liljestrand: Skand. Arch. Physiol. (D.) **55**, 1 (1929). — [9] Frank u. Kratz: Ther. Gegenw. **1932**, 394. — [10] Baumann: Arch. klin. Chir. **186**, 461 (1936). — [11] Lasch: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **124**, 231 (1927). — [12] Ehrismann u. Maloff: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **136**, 172

(1928). — [13] Bertram: Zbl. inn. Med. **1931**, 34. — [14] Rühl: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **164**, 8 (1932). — [15] Kottlors u. Faust: Med. Klin. **1931**, 471. — [16] Poczka u. Steigerwald: Z. exper. Med. **96**, 20 (1935). — [17] Bertram: Erg. inn. Med. **43**, 258 (1932). — [18] Pflug: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 64 (1938). — [19] Brentano u. Pflug: Klin. Wschr. **1938**, 979. — [20] Thaddea u. Köhns: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **199**, 642 (1942). — [21] Mergoni e Fiorani: Gi. Clin. med. **23**, 243 (1942). — [22] Sherman and Spohn: J. amer. chem. Soc. **45**, 2719 (1923). — [23] McCollum u. Mitarb. : J. biol. Chem. (Am.) **33**, 55 (1918). — [24] Pflüger: Pflügers Arch. **129**, 374 (1909). — [25] Good, Kramer and Somogyi: J. biol. Chem. (Am.) **100**, 485 (1933). — [26] Shaffer and Somogyi: J. biol. Chem. (Am.) **100**, 695 (1933). — [27] Cori u. Cori: Biochem. Z. **206**, 39 (1929). — [28] Haendel u. Munilla: Biochem. Z. **212**, 35 (1929). — [29] Lawrence and McCance: Biochem. J. (Brit.) **25**, 570 (1931). — [30] Long and Evans: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **30**, 186 (1932). — [31] Evans: J. Physiol. (Brit.) **82**, 468 (1934). — [32] Chang: Quart. J. exper. Physiol. **26**, 285 (1937). — [33] Liebig: Z. exper. Med. **109**, 190 (1941). — [34] Himwich: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **25**, 347 (1928). — [35] McGinty and Miller: Amer. J. Physiol. **103**, 702 (1933). — [36] Evans: Quart. J. exper. Physiol. **24**, 347 (1935). — [37] Rühl: Klin. Wschr. **1934**, 1529. — [38] Vischer: Amer J. Physiol. (Brit.) **94**, 630 (1930). — [39] Cruickshank: J. Physiol. (Brit.) **47**, 1 (1913). — [40] McDonald: Amer. J. Physiol. **124**, 742 (1938).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Untersuchungen an Eiweißkörpern mit Natriumhypochlorit.

Von

H. Herken und J. Schunk.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. April 1948.)

Bei Untersuchungen der Wirkung von Hypochlorit auf organische Verbindungen wurde schon frühzeitig festgestellt, daß die Reaktion mit Eiweißkörpern eine besondere Rolle spielt[1]. So wird z. B. die bakterizide Wirkung von Natriumhypochlorit in Gegenwart von Pferdeserum herabgesetzt. Bei der Einwirkung dieses Oxydationsmittels auf Proteine fand N. O. Engfeldt[2] einen Abbau der Moleküle unter Entwicklung von Stickstoff und Kohlensäure. In gewissem Gegensatz dazu stehen die klinischen Erfahrungen mit der Dakinschen Lösung, die nur geringe gewebeschädigende Eigenschaften der Substanz aufgezeigt haben.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man vermuten, daß nicht alle Proteine gleichmäßig reagieren, sondern daß die Wirkung von einer Affinität der Substanz zu bestimmten Gruppen des Eiweißmoleküls abhängig ist. Wenn dies der Fall wäre, müßten sich bei der Einwirkung von Hypochlorit auf Eiweißkörper verschiedener Struktur deutliche Unterschiede zeigen. Für uns war diese Frage auch im Hinblick auf frühere Untersuchungen an Serumproteinen[3] von besonderem Interesse.

I.

Wir haben daher zunächst in orientierenden Versuchen geprüft, ob sich besondere Abweichungen bei der Einwirkung von Hypochlorit auf diese Eiweißkörper erkennen lassen. Physikalische und analytisch-chemische Untersuchungen haben mit Sicherheit ergeben, daß es sich bei den Serumproteinen um Gemische verschiedener Molekülgröße und Struktur handelt. Die strukturellen Unterschiede sind besonders deutlich zwischen Albumin und γ-Globulin[4], so daß verschiedene Reaktionen erwartet werden können, wenn die oben geäußerte Vermutung richtig ist. Die Serumeiweißlösungen wurden nach verschieden langer

[1] Dakin, H. D.: Brit. med. J. **2**, 318, 609, 809 (1915). — [2] Engfeldt, N. O.: Z. physiol. Chem. **121**, 18 (1922). — [3] Herken, H. u. H. Remmer: Klin. Wschr. **1947**, 211, 469. — [4] Brand, E., B. Kassel and L. J. Saidel: J. clin. Invest. **23** 437 (1944).

Einwirkung von NaOCl ähnlich wie in früheren Versuchen[5] mit steigenden Konzentrationen eines Neutralsalzes versetzt, und die Stärke der entstandenen Trübung mit einem Photozellenkolorimeter gemessen. An Stelle des früher verwendeten Ammoniumsulfates wurde Na_2SO_4 benutzt, da $(NH_4)_2SO_4$ mit Hypochlorit unter Entwicklung von Stickstoff reagiert.

Die Ansätze zu diesen Versuchen waren folgende: 0,5 cm³ Serum, 3,5 cm³ physiologische Kochsalzlösung, 5 cm³ m/15 Phosphytpuffer p_H 6,8 1,0 cm³ NaOCl-Lösung mit 30 mg NaOCl. (Nach Zusatz von Essigsäure durch Titration mit Natriumthiosulfat ermittelt.) Das Hypochlorit, durch Einleiten von Chlor in n-NaOH hergestellt, wurde unmittelbar vor dem Versuch durch Zugabe von m-Essigsäure mit der Glaselektrode auf p_H 7,7 eingestellt. Diese Neutralisation war vor allem für die Durchführung der später erwähnten manometrischen Versuche notwendig. 0,1 cm³ dieses Ansatzes werden zu 5 cm³ Na_2SO_4-Lösungen steigender Konzentration gegeben. Die Messung der Trübung erfolgte im Photozellenkolorimeter nach R. Havemann[6]. Die erhaltenen Werte wurden in willkürlichen Einheiten auf der Ordinate eingetragen, auf der Abszisse sind die steigenden Konzentrationen des Neutralsalzes verzeichnet. Sämtliche Stickstoffbestimmungen wurden mit der Mikrokjeldahlmethode vorgenommen.

In der folgenden Abb. 1 ist die Wirkung von Natriumhypochlorit in Gestalt von Kurven mit Hilfe derartiger Messungen wiedergegeben, wobei angenommen wird, daß sich ein Abbau im Bereich der verschiedenen Proteinanteile in einer Abnahme der Trübungsintensität äußert.

Im Rahmen dieser Arbeit interessiert vor allem der Befund, daß die verschiedenen Eiweißkörper des Serums tatsächlich *nicht* gleichmäßig angegriffen werden. Besonders deutlich sind die Unterschiede zwischen dem am leichtesten fällbaren Anteil des Globulins — er entspricht etwa dem γ-Globulin — und dem Albumin. Als Zeichen des Proteinabbaus stieg der sog. Rest-N nach Fällung der hochmolekularen Eiweißkörper mit Trichloressigsäure auf 182 mg-%.

Der folgende Versuch wurde in der gleichen Anordnung nur ohne Phosphatpuffer durchgeführt (Abb. 2).

Abgesehen von der auf dem Fortfall des Puffers beruhenden geringeren Trübungsintensität entspricht das Ergebnis im Prinzip dem des vorigen Versuches. Bei einer Konzentration von 21 g Na_2SO_4 in 100 H_2O läßt sich noch keine deutliche Wirkung von NaOCl selbst nach 24stündiger Einwirkung erkennen. Der nach dieser Versuchszeit erhaltene

[5] Herken, H. u. H. Remmer: Dtsch. Gesdh.wes. **1946**, 683. — Ärztl. Wschr. **1946 I**, 289. — [6] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939); **306**, 224 (1940).

Rest-N von 630 mg-% muß daher vorwiegend auf die Zerstörung des Albumins zurückgeführt werden.

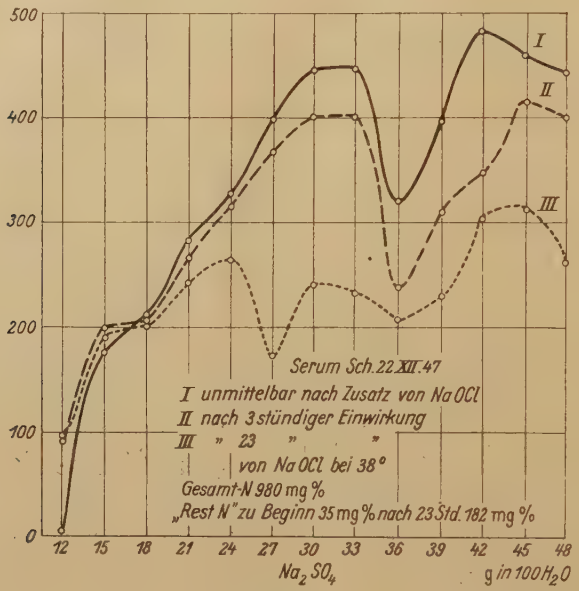


Abb. 1.

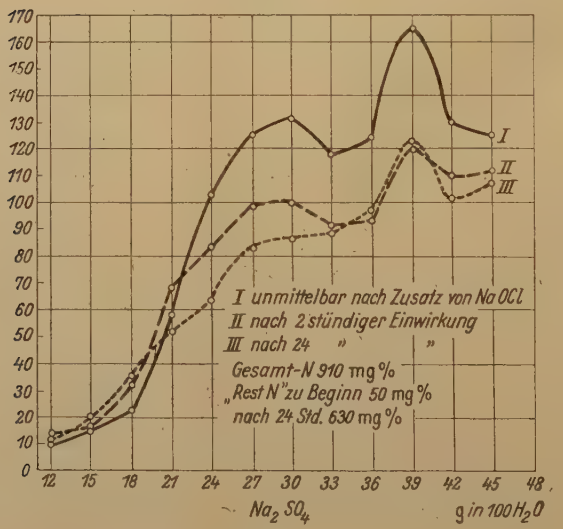


Abb. 2.

Auf Grund dieser Resultate haben wir uns mit dem Abbau von Eiweißkörpern durch NaOCl eingehender beschäftigt. N. O. Engfeldt[2]

hat bereits bei seinen Versuchen auf den N-Verlust durch Entwicklung von gasförmigem Stickstoff beim Abbau der Proteine aufmerksam gemacht. Er nahm an, daß dieser Stickstoff neben Kohlensäure bei der Spaltung von Peptidbindungen frei würde. Es läßt sich aber in einem einfachen Versuch zeigen, daß die Öffnung von Peptidbindungen nicht unbedingt mit Verlust von Stickstoff einhergeht. Bestimmt man nach Einwirkung von Hypochlorit auf Serumeiweißkörper zu verschiedenen Zeiten den Gesamt-N und den Reststickstoff, so ergibt sich, daß nur in der ersten halben Stunde Stickstoff entweicht. Bei der weiteren Proteinspaltung ist das nicht mehr der Fall, denn der Gesamtstickstoffwert bleibt nach dieser Zeit konstant, während der Reststickstoff deutlich zunimmt.

Tabelle 1. *Einwirkung von Natriumhypochlorit auf Serumproteine.*
Ansatz a: 0,5 cm³ Serum, 3,5 cm³ NaCl, 1,0 cm³ NaOCl (30 mg). Ansatz b: 0,5 cm³ Serum, 3,5 cm³ Phosphatpuffer p_H 6,8; 1 cm³ NaOCl (30 mg).

Serum	Werte zu Beginn des Versuches	Ansatz	Nach 30 Min. Einwirkung von NaOCl	Nach 24 Std. Einwirkung von NaOCl
P	Gesamt-N 1120 mg-%	a	Gesamt-N 980 mg-% Rest-N 218 mg-%	980 mg-% 447 mg-%
	Rest-N 36 mg-%	b	Gesamt-N 980 mg-% Rest-N 226 mg-%	980 mg-% 438 mg-%
R	Gesamt-N 980 mg-%	a	Gesamt-N 900 mg-% Rest-N —	900 mg-% 630 mg-%
	Rest-N 40 mg-%	b	Gesamt-N 900 mg-% Rest-N —	920 mg-% 630 mg-%
S	Gesamt-N 1120 mg-% Rest-N 32 mg-%	a	Gesamt-N 980 mg-% Rest-N 385 mg-%	980 mg-% 770 mg-%
H	Gesamt-N 1310 mg-% Rest-N 42 mg-%	a	Gesamt-N 1152 mg-% Rest-N 210 mg-%	1150 mg-% 516 mg-%
K	Gesamt-N 1190 mg-%	a	Gesamt-N 1100 mg-% Rest-N —	1100 mg-% 267 mg-%
	Rest-N 40 mg-%	b	Gesamt-N 1100 mg-% Rest-N —	1100 mg-% 275 mg-%

An diesen Versuchen ist bemerkenswert, daß der Verlust an gasförmigem Stickstoff bei den verschiedenen Seren nicht gleich groß ist, während Paralleluntersuchungen mit einer bestimmten Menge Hypochlorit am gleichen Serum mit und ohne Phosphatpuffer völlig übereinstimmende Werte ergeben. Die Abnahme des Gesamtstickstoffs ist besonders gering bei dem Serum K und R, das von Patienten mit chronischem Hungerödem stammt. Auf diesen Befund werden wir

im Zusammenhang mit früheren Beobachtungen an anderer Stelle ausführlich eingehen.

II.

Nach diesen Versuchen stand fest, daß ein näherer Einblick in die Reaktion zwischen Eiweißkörpern und Hypochlorit nur bei quantitativer Erfassung der freigesetzten Stickstoff- und Kohlensäuremenge möglich war, wobei wir vor allem durch Heranziehung geeigneter synthetischer Substrate weiterzukommen hofften.

Nach Untersuchungen von K. Langheld [7] reagiert Natriumhypochlorit mit α-Aminosäuren unter Bildung der Natriumsalze der stickstoffchlorierten Säure. Diese Substanz ist nur bei niedrigen Temperaturen kurze Zeit haltbar. Sie zerfällt, unter Decarboxylierung, wobei wahrscheinlich oxydative Desaminierung und hydrolytischer Zerfall der chlorierten Aminogruppe nebeneinander verlaufen. Doch fand schon H. D. Dakin [8], daß der Abbau der verschiedenen Aminosäuren nicht einheitlich vor sich geht, denn bei der Einwirkung von Chloramin T auf Glutaminsäure und Aspraraginsäure entstanden intermediär verschiedene Reaktionsprodukte. Die Glutaminsäure wird nach Decarboxylierung auf dem Wege über eine Cyanpropionsäure in Bernsteinsäure umgewandelt, wobei 1 mol CO_2 frei wird. Der Abbau der Asparaginsäure ist ein wesentlich komplizierterer Vorgang, bei dem 2 mol CO_2 entstehen. P. P. Cohen [9] hat weitere Aminosäuren untersucht und ebenfalls bestimmte Mengen CO_2 je Mol Aminosäure nach der Einwirkung von Chloramin T gefunden.

Für unsere Untersuchungen mußten wir Natriumhypochlorit verwenden, da Chloramin unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht imstande war, Peptidbindungen zu spalten.

Diese Versuche wurden in der von O. Warburg [10] angegebenen Apparatur durchgeführt. Als Versuchsgefäße dienten kegelförmige Gefäße mit einem seitlichen Anhang. Zur Ermittlung des Stickstoffes haben wir in Parallelversuchen gleiche Gefäße mit besonders großem Einsatz zur Aufnahme der Kalilauge benutzt, um bei vergrößerter Oberfläche eine möglichst schnelle Absorption der Kohlensäure zu erreichen.

Es wurden Untersuchungen an Aminosäuren, Peptiden, Säureamiden und Proteinen vorgenommen. Hierbei ergaben sich zunächst einige Schwierigkeiten, weil zur Spaltung von Peptidbindungen ein erheblicher *Überschuß* an Natriumhypochlorit notwendig war. Die Versuchsbedingungen mußten daher so gewählt werden, daß die gesamten Reaktionen bei annähernd neutralem p_H abliefen. So wurde eine zu schnelle Hypochloritzerstörung vermieden. Andererseits durften die Lösungen nicht zu alkalisch sein, um die Messung der freiwerdenden Kohlensäure nicht zu beeinträchtigen.

Aus diesem Grunde wurde die stark alkalische NaOCl-Lösung unmittelbar vor dem Versuch unter Verwendung einer Glaselektrode mit m-Essigsäure auf p_H 7,7

[7] Langheld, K.: Ber. **42**, 1, 392 (1909). — [8] Dakin, H. D.: Biochem. J. (Brit.) **11**, 79 (1917). — [9] Cohen, P. P.: J. biol. Chem. (Am.) **136**, 572 (1940). — [10] Warburg, O.: Der Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer 1926.

eingestellt. Von dieser Lösung kam jeweils 0,5 cm³ in wechselnden Verdünnungen in den seitlichen Anhang der Gefäße. Die Mengen Hypochlorit, vor jedem Versuch durch Titration mit Natriumthiosulfat ermittelt, sind bei den einzelnen Experimenten angegeben. Der Hauptraum der Gefäße enthielt jeweils 1,5 cm³ m/10-Phosphatpuffer p_H 6,3, dem 0,5 cm³ der jeweiligen Substratlösung zugegeben wurden. Manometer und Gefäße wurden zu Beginn der Versuche mit Stickstoff durchströmt. Nach Temperatur- und Druckausgleich wurde die Hypochloritlösung in den Hauptraum der Gefäße eingekippt. Wie die Ablesungen am Thermomanometer, das kein Substrat enthielt, zeigten, kam es unter diesen Versuchsbedingungen beim Einkippen nur zu einer sehr geringen Zerstörung von Hypochlorit. In den Versuchen, die zur Ermittlung des Stickstoffs durchgeführt wurden, enthielten die Gefäße 1,0 cm³ 10% KOH im vergrößerten Einsatz. Versuchstemperatur in allen Fällen 38°.

Da die bisher vorliegenden Untersuchungen an Aminosäuren unter anderen Versuchsbedingungen vorgenommen waren, mußten wir zunächst feststellen, wieviel Kohlensäure beim Abbau der Aminosäuren mit Hypochlorit in unserem Falle erhalten wurde, zumal bei der Verwendung von sekundärem Phosphat auf Grund der Beobachtungen von O. Warburg[11] eine gewisse Retention von CO_2 möglich schien. In der Tabelle 2 sind solche Untersuchungen zusammengestellt. Hierbei sollte auch die Frage geklärt werden, ob beim Abbau von Aminosäuren neben Kohlensäure auch Stickstoff entsteht.

Tabelle 2. *Ansätze mit Phosphatpuffer m/10, p_H 6,3.*

Aminosäure-Art	Menge in cm³ m/100 Lösung	Menge NaOCl in mg	CO in mm³		N in mm³
			berechnet auf eine Carboxylgruppe	gefunden	
Alanin	0,5	3,75	112	101	0
Leucin	0,5	3,75	112	110	0
Glykokoll	0,25	3,75	56	101	0
Tyrosin	0,25	3,75	56	105	0
Phenylalanin	0,5	3,75	112	105	0
Asparaginsäure	0,5	3,75	112	214	0
Glutaminsäure	0,5	3,75	112	100	0
Tryptophan	0,25	3,75	56	102	20
Arginin	0,25	3,75	56	117	56
Lysin	0,5	3,75	112	114	0

Glutaminsäure liefert unter unseren Versuchsbedingungen beim Abbau durch Hypochlorit 1 mol CO_2, Asparaginsäure dagegen 2 mol. Diese Werte stimmen mit den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen überein. Manche Aminosäuren liefern mehr CO_2, als auf Grund der vorhandenen Carboxylgruppen zu erwarten war. Dies gilt z. B. für Glycin, Tyrosin und Tryptophan. Die Befunde können so gedeutet werden, daß

[11] Warburg, O.: Biochem. Z. 177, 471 (1926). — H. A. Krebs in: Die Methodik der Fermente von Oppenheimer und Pincussen, S. 643. Berlin 1929.

die nach Angaben von K. Langheld [7] intermediär entstehenden Aldehyde oxydiert werden und so ein weiteres Mol CO_2 liefern. Interessant ist die Beobachtung, daß beim Abbau von 1 mol Tyrosin 2 mol CO_2 registriert werden konnten, während Phenylalanin, in Übereinstimmung mit Ergebnissen von P. P. Cohen [9], der allerdings Chloramin zur Oxydation verwendete, nur 1 mol CO_2 ergab. Hier verändert die Einführung der Hydroxylgruppe offenbar das gesamte Molekül, was in der andersartigen Oxydation der Seitenkette zum Ausdruck kommt. Dieser Befund mag auch ein Hinweis dafür sein, welche besonderen Schwierigkeiten für die Deutung der Beziehungen zwischen pharmakologischer Wirkung und chemischer Konstitution von Verbindungen entstehen, die sich „nur" durch eine Hydroxylgruppe voneinander unterscheiden. Beim Tryptophan, das bei der Oxydation durch Hypochlorit ebenfalls 2 mol CO_2 liefert, konnte eine bestimmte Menge Stickstoff nachgewiesen werden, die sehr wahrscheinlich aus dem Pyrrolring stammt, da beim Abbau von Alanin kein gasförmiger Stickstoff festgestellt wurde. Weit größere Mengen Stickstoffgas entstehen aber bei der Reaktion mit Arginin. Unter der Annahme, daß die freien basischen Gruppen im Guanidinrest reagieren, wird die theoretisch mögliche Menge als Gas freigesetzt. Wahrscheinlich beruht die bei Einwirkung von Hypochlorit auf Serumproteine beobachtete Abnahme des Gesamtstickstoffes zu einem wesentlichen Teil auf der Reaktion dieser polaren Gruppen, die möglich ist, ohne daß gleichzeitig auch Peptidbindungen aufgespalten werden. Dagegen ist die Abnahme des Gesamtstickstoffes von der Menge des auf die Proteine einwirkenden Oxydationsmittels abhängig. Der Stickstoffverlust muß daher noch andere Quellen haben. 1 mol Arginin liefert, wie einige andere Aminosäuren bei der Oxydation, 2 mol CO_2. Dieses zweite Mol kann entweder aus der weiteren Oxydation der Kohlenstoffkette oder aus dem Abbau der Guanidinogruppe stammen. Weiter unten angeführte Versuche sprechen für die erste Erklärung. Um die mögliche Retention von CO_2 sicher auszuschließen, haben wir die gleichen Messungen an einigen

Tabelle 3. *Ansätze mit Borat-Bernsteinsäurepuffer m/15, p_H 4,7.*

Aminosäure-Art	Menge in cm³ m/100 Lösung	Menge NaOCl in mg	CO_2 in mm³	
			berechnet auf eine Carboxylgruppe	gefunden
Alanin	0,5	3,75	112	118
Leucin	0,5	3,75	112	122
Glykokoll	0,25	3,75	56	101
Phenylalanin	0,25	3,75	56	56
Glutaminsäure	0,5	7,5	112	100
Asparaginsäure	0,5	7,5	112	242

Aminosäuren unter Verwendung eines m/15-Bernsteinsäure-Boratpuffers bei p_H 4,7 durchgeführt, wobei uns auch die Frage interessierte, ob die Reaktion von Hypochlorit mit den verschiedenen Aminosäuren durch die H-Ionenkonzentration beeinflußt wird. Die in der Tabelle 3 zusammengestellten Zahlen stimmen aber mit den vorigen Versuchsergebnissen im wesentlichen überein. (Eine gewisse Ausnahme macht vielleicht die Asparaginsäure, bei der die bei verschiedenem p_H entwickelten CO_2-Mengen stärker differieren.)

Wie sich aus dem Vergleich der Versuchsergebnisse bei verschiedenem p_H ergibt, findet keine deutlich nachweisbare Retention von CO_2 bei Anwendung des Phosphatpuffers statt, denn sonst müßten alle Aminosäuren gleichmäßig betroffen sein.

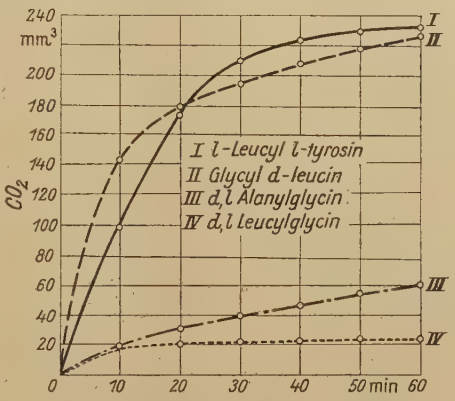


Abb. 3. Abbau von Dipeptiden durch 12,7 mg Hypochlorit.

III.

Unter der Voraussetzung, daß Hypochlorit in der Lage ist, Peptidbindungen zu spalten, müssen mit dieser Methodik auch Messungen an Peptiden und Proteinen möglich sein, wenn die darin vorhandenen Aminosäuren anschließend in gleicher Weise decarboxyliert werden. Die Abb. 3 zeigt derartige Spaltungen von Dipeptiden, die durch fortlaufende Registrierung der entstehenden Kohlensäure verfolgt wurden.

Auffallend ist der Befund, daß die Geschwindigkeit des Abbaues bei den 4 untersuchten Dipeptiden große Unterschiede zeigt. Die maximal mögliche CO_2-Menge beträgt nach Spaltung der Peptidbindung auf Grund der Messungen an Aminosäuren 336 cm³, da alle Peptide eine Aminosäure enthalten, die je mol 1 mol CO_2 abgibt (Alanin, Leucin), und eine weitere, die bei der Oxydation durch Hypochlorit 2 mol CO_2 liefert (Tyrosin, Glycin). Wie aus der folgenden Abb. 4 hervorgeht, können aber die Unterschiede nicht durch einen verschiedenen schnellen Abbau der Aminosäuren erklärt werden.

Man muß daher annehmen, daß die Öffnung der Peptidbindungen je nach der *Struktur* des Peptids mit verschieden großer Geschwindigkeit erfolgt.

Auch bei enzymatischen Untersuchungen mit synthetischen Substraten ergaben sich vielfache Hinweise für eine verschieden schnell verlaufende Hydrolyse der Peptidbindungen in Abhängigkeit von der

Struktur des verwendeten Peptids. Dieser Vorgang wurde in vielen Fällen damit erklärt, daß für jedes Substrat ein besonderes Ferment zur Verfügung stünde. Damit können wir die oben angeführten Unterschiede natürlich nicht erklären. Merkwürdigerweise wurden hierbei chemisch verschiedene Eigenschaften der Peptidbindungen in den Substraten auffallend wenig diskutiert. Andererseits liegen aber zahlreiche Beobachtungen über die Säurehydrolyse von Eiweißkörpern vor, die für eine ungleich schnelle Hydrolyse der Peptidbindungen in den einzelnen Proteinen sprechen[12]. Solche auffälligen Spaltungsunterschiede konnten auch F. Kögl, H. Erxleben und G. J. van Veersen[13] bei der Auswertung ihrer Untersuchungen nach Zusatz von deuterierter Glutaminsäure zu den Proteinhydrolysaten feststellen. Hierbei besprechen die Autoren auch die Möglichkeit, daß „Epiproteine" bzw. „Epipolypeptide" bei der Säurehydrolyse rascher angegriffen werden, als die entsprechenden Verbindungen mit durchgehender l-Konfiguration. Wegen der besonderen Bedeutung dieser Frage haben wir daher in weiteren Versuchen die Spaltung einiger Dipeptide verschiedener Struktur durch eine bestimmte Menge Natriumhypochlorit untersucht, wobei auch das Verhalten der optischen Antipoden eines Dipeptids,

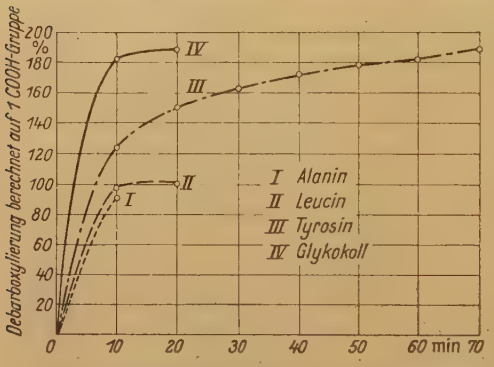


Abb. 4. Einwirkung von NaOCl bei Aminosäuren.

Tabelle 4. *Spaltung von Dipeptiden. Ansätze mit m/10-Phosphatpuffer p_H 6,3.*

Substrat			CO_2 in mm³				Spaltung in %	N_2 in mm³.
Art	Menge in cm³ m/100 Lösung	NaOCl in mg	30 Min.	60 Min.	90 Min.	maximal mögliche Menge auf 3 C-Atome berechnet		
d-l-Alanylglycin . .	0,5	12,7	38	59	81	336	24	10
d-l-Leucylglycin . .	0,5	12,7	20	22	22	336	7	0
d-l-Valylglycin . .	0,5	12,7	16	16	16	336	5	0
l-Leucyl-l-tyrosin .	0,5	12,7	193	224	244	336	72	7
Glycyl-d-Leucin . .	0,5	12,7	207	229	248	336	74	10
Glycyl-l-Leucin . .	0,5	12,7	172	217	2.2	336	72	4

[12] Vgl. E. Abderhalden u. H. Sickel: Z. physiol. Chem. **170**, 134 (1927). E. Abderhalden u. H. Brockmann: Z. physiol. Chem. **170**, 146 (1927). — E. Abderhalden u. S. Suzuki: Z. physiol. Chem. **170**, 158 (1927). — [13] Kögl, F., H. Erxleben u. G. J. van Veersen: Z. physiol. Chem. **277**, 251 (1943).

und zwar von Glycyl-l-Leucin und Glycyl-d-Leucin geprüft werden konnte. Neben CO_2 wurde in Parallelversuchen der bei der Spaltung freigesetzte Stickstoff gemessen. Wie die Versuchsergebnisse zeigen, ist er in allen Fällen sehr gering.

Über die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Struktur der Peptide ist zu sagen, daß der Bau der Aminosäure am Carboxylende des Peptids hierfür besondere Bedeutung zu haben scheint, wie aus dem Vergleich des Abbaues von Leucyl-Tyrosin, d-l-Leucylglycin und Glycyl-Leucin hervorgeht. Hier ergeben sich interessante Parallelen zu Untersuchungen mit proteolytischen Fermenten, die noch besonders durch die Beobachtung verstärkt werden, daß eine *freie α-Aminogruppe* zur Auslösung der Reaktion wichtig ist. Das gilt sowohl für den Abbau der Aminosäuren, worauf K. Langheld schon hingewiesen hat, wie für die Spaltung der Peptidbindung, wie aus Untersuchungen mit Benzoylglykokoll, Carbobenzoxy-l-Leucin und Carbobenzoxyglycyl-d-l-alanin hervorgeht, bei denen sich nach Einwirkung von Hypochlorit keine CO_2-Entwicklung feststellen läßt. Nach Versuchen von St. Goldschmidt und K. Strauss[14] benötigt Hypobromit ebenfalls freie α-Aminogruppen für seine Reaktion mit

Tabelle 5. *Einwirkung von NaOCl auf Substrate ohne freie Aminogruppe.*

Substrat		NaOCl in mg	CO_2 in mm³		N_2 in mm³	Versuchsdauer nach Zusatz von NaOCl in Min.
Art	Menge in cm³ m/100 Lösung		berechnet auf eine COOH-Gruppe	gefundene Menge		
Carbobenzoxy-Glycyl-d,l-alanin	0,5	12,7	112	0	0	60
Carbobenzoxy-l-Leucin.	0,5	12,7	112	0	0	60
Benzoyl-Glykokoll . .	0,25	12,7	56	0	0	60

Tabelle 6. *Spaltung von Tripeptiden durch NaOCl. Ansätze mit Phosphatpuffer m/10 p_H 6,3.*

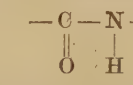
Peptid		NaOCl in mg	CO_2 in mm³				Spaltung in %	N_2 in mm³
Art	Menge in cm³ m/100 Lösung		gefunden			maximal mögliche Menge für 5 C-Atome		
			30 Min.	60 Min.	90 Min.			
Alanylglycylglycin .	0,25	3,75	70	98	116	280	42	17
	0,25	3,75	83	101	106	280	38	31
Leucylglycylglycin .	0,25	3,75	126	177	192	280	69	12
	0,25	3,75	88	160	185	280	66	13
Aminobutyryl-glycylglycin . . .	0,25	3,75	94	143	160	280	57	22

[14] Goldschmidt, St. u. K. Strauss: Ann. Chem. **471**, 1 (1929).

Peptiden, jedoch waren die Peptidbindungen auch in längeren Peptidketten im allgemeinen gegen Hypobromit beständig.

Auch bei Tripeptiden ist eine deutliche Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Struktur der Substrate vorhanden, obwohl die untersuchten Verbindungen sich nur durch den Bau der Aminosäuren am *Aminoende* des Peptids unterscheiden.

Die zur nahezu vollständigen Spaltung von Leucylglycylglycin notwendige Menge NaOCl ist wesentlich geringer als die, welche beim Versuch mit Leucylglycin zur Anwendung kam. Auch das spricht für Unterschiede in der Festigkeit der



-Bindung

bei den einzelnen Substraten. Ob die bestehenden Unterschiede in *allen* Fällen allein durch die Annahme einer verschiedenen Stabilität der Peptidverbindungen befriedigend erklärt werden können, ist allerdings noch zweifelhaft, solange sich nicht ausschließen läßt, daß bei Einwirkung von Natriumhypochlorit auf die Dipeptide Leucylglycin, Alanyl- und Valylglycin-Verbindungen entstehen, die z. B. durch Ringschluß nach Art von Diketopiperazinen nicht mehr reaktionsfähig sind. Darüber sind Untersuchungen im Gange. Schließlich muß noch an die Möglichkeit gedacht werden, daß für die Spaltung der Peptidbindung eine katalytische Substanz notwendig sein könnte, deren Entstehung von der Struktur der Peptide abhängt. Hierüber werden reaktionskinetische Messungen Aufschluß geben können.

IV.

Bevor wir auf die abschließenden Versuche an Proteinen näher eingehen, sollen noch einige Untersuchungen an Säureamiden angeführt werden.

Tabelle 7. *Spaltung von Säureamiden. Ansätze mit m/10-Phosphatpuffer p_H 6,3.*

Amid		NaOCl in mg	CO_2 in mm³		CO_2 in %	N_2 in mm³	Versuchsdauer nach Zusatz von NaOCl in Min.
Art	Menge in cm³ m/100 Lösung		berechnet auf eine COOH-Gruppe	gefundene Menge			
Asparagin	0,25	12,7	56	109	198	27	20
Benzoylarginin-amid	0,25	3,75	56	58	104	79	40
	0,25	12,7	56	57	102	76	10
Acetamid	0,25	12,7	56	9	16	9	40
Benzamid	0,25	12,7	56	12	21	12	20

Hohe Dosen von Natriumhypochlorit scheinen eine gewisse Spaltung von Acetamid und Benzamid unter den angewandten Bedingungen möglich zu machen. Vergleicht man aber die bei Anwendung von Acetamid, Benzamid und Asparagin als Substrat erhaltenen Werte, so scheint auch hier eine freie α-Aminogruppe die Spaltung einer Säureamidbindung zu beschleunigen. Die Kohlensäuremenge entspricht mit 2 mol je mol Asparagin dem beim Abbau von Asparaginsäure gemessenen Wert, die Spaltung des Säureamids liefert 27 mm^3 Stickstoff, d. h. etwa die theoretisch mögliche Menge. Im Hinblick auf die Hydrolyse von Peptidbindungen in Proteinen interessierte uns die Frage, ob die Guanidinogruppe im Arginin ebenfalls einen Einfluß auf die Spaltung einer Säureamidbindung hat. Wir haben solche Untersuchungen an einem Argininamid durchgeführt, bei dem die α-Aminogruppe benzoyliert war, nachdem uns aus Untersuchungen an der Hippursäure bekannt war, daß diese Bindung durch Hypochlorit nicht gespalten wird. Die entwickelte Menge an gasförmigem Stickstoff liegt bei den Versuchen mit Monobenzoylargininamid um ungefähr 50% höher und kann als Beweis für die erfolgte Spaltung der Säureamidgruppe angesehen werden. Im Gegensatz zum Arginin liefert das monobenzoylierte Amid der gleichen Aminosäure nur 1 mol CO_2. Dies läßt vermuten, daß das zweite Mol Kohlensäure nicht aus dem Abbau der Guanidinogruppe stammt, sondern wie beim Tyrosin, Tryptophan und Glykokoll bei der weiteren Oxydation der Kohlenstoffkette entsteht. Im Monobenzoylargininamid wird diese Oxydation nicht möglich sein, da die α-Aminogruppe auf Grund der Benzoylierung nicht reaktionsfähig ist. Wenn die Reaktion von Hypochlorit mit der Guanidinogruppe im Arginin auch Spaltungen von Peptidbindungen katalysiert, so kann dieser Vorgang für den Abbau strukturell verschiedener Proteine von Bedeutung sein.

V.

Für die weiteren Versuche haben wir Serum-Eiweißkörper benutzt, die durch Dialyse bzw. durch Fällung mit Na_2SO_4 in Albumin und Globulin aufgetrennt werden. Obwohl die Proteine elektrophoretisch keineswegs einheitliche Körper darstellen, so genügt diese Aufarbeitung doch, um Unterschiede im Ablauf der Reaktion mit Hypochlorit deutlich zu machen.

In zwei Versuchen wird das Serumalbumin wesentlich *schneller* zerstört als Globulin. Auch die entwickelten Stickstoffmengen sind verschieden groß. Beim Globulin scheint die Darstellung insofern noch eine Rolle zu spielen, als die durch Dialyse gewonnenen Anteile schlechter reagieren als das bei Halbsättigung mit Na_2SO_4

Tabelle 8. *Spaltung von Proteinen. Ansätze mit m/10-Phosphatpuffer p_H 6,3.*

Datum	Substrat		NaOCl in mg	CO_2 in mm³			N_2 in mm³	Trennung von Albumin und Globulin
	Art	Menge in γ-N		30 Min.	60 Min.	90 Min.		
1. 3. 48	Nativserum (Pferd)	100	12,7	85	118	137	5	
	Globumin	100	12 7	76	103	120	20	Fällung mit Na_2SO_4 (Halbsättigung bei 37°)
	Alobulin	100	12.7	74	98	111	13	
12. 3. 48	Nativserum (Pferd)	100	12,7	68	103	121	7	
	Albumin	100	12,7	130	195	229	46	Dialyse gegen Aqua dest.
	Globulin	100	12,7	6	7	7	—	
13. 3. 48	Albumin (Mensch)	200	12,7	121	179	210	53	Fällung mit Na_2SO_4 (Halbsättigung bei 37°)
	Globulin	200	12,7	90	134	154	36	

abgetrennte Globulin. Dieser Befund ist eine Stütze für die zu Beginn der Arbeit gemachte Beobachtung, daß die am leichtesten fällbaren Anteile der Globuline am geringsten durch Hypochlorit zerstört werden, denn bei dem durch Dialyse gewonnenen Protein fehlt das erst durch höhere Konzentration des Neutralsalzes fällbare sog. Pseudoglobulin, das bekanntlich aus einer Mischung von vorwiegend α- und β-Globulin besteht. Die Untersuchungen an synthetischen Substraten haben ergeben, daß zur Auslösung der Spaltung von Peptidbindungen in erster Linie freie α-Aminogruppen notwendig sind, und daß die Geschwindigkeit des Abbaues von der Struktur der Eiweißkörper abhängt. Nun liegen bereits Untersuchungen über Vorkommen und Menge freier α-Aminogruppen in Serumproteinen vor, deren Zahl im Serumalbumin ganz erheblich höher ist als im Serumglobulin. Prüft man die Eiweißkörper auf weitere strukturelle Unterschiede, so wird verständlich, warum sich beide Proteine gegenüber Hypochlorit völlig anders verhalten. Die folgenden Angaben sind einer Arbeit von E. Brand, B. Kassel und L. J. Saidel [4] entnommen, die Untersuchungen an elektrophoretisch reinen Proteinen durchgeführt haben *.

Die besondere Bedeutung der mitgeteilten Befunde für die *Differenzierung* der Serumproteine ergibt sich aus den Beobachtungen, daß die Proteine durch ihre polaren basischen und sauren Gruppen mit anderen organischen Substanzen wie Kohlenhydraten und Lipoiden Verbindungen von mehr oder weniger intensiver Stabilität eingehen können. Diese Reaktionen sind natürlich auch für die Wirkung

* Nach mündlicher Mitteilung von Prof. J. T. Edsall sollen die Autoren die Werte inzwischen dahingehend korrigiert haben, daß die Angaben für freien α-Aminostickstoff niedriger und die Lysinwerte entsprechend höher sind.

Tabelle 9. *Zusammensetzung von menschlichem Serum. Albumin und γ-Globulin.* (Angaben in %.)

	Serum-Albumin	γ-Globulin
Gesamt-Stickstoff	15,95	16,03
Freier α-Aminostickstoff	0,72	0,21
Amidstickstoff	1,07	1,35
Arginin	6,15	4,80
Histidin	3,52	2,50
Lysin	5,8	6,7
Gesamt-Schwefel	1,96	1,02
Cystin	0,70	0,70
Cystin (Halb)	5,58	2,37
Methionin	1,28	1,06
Tryptophan	0,19	2,86
Tyrosin	4,66	6,75
Serin	3,7	11,4
Threonin	5,03	8,36
Hydroxyprolin	0	—
Leucin	11,9	9,32
Asparaginsäure	9,9	—
Glutaminsäure	17,1	—

von Hypochlorit auf diese Eiweißkörper von Bedeutung und können das verschiedene Verhalten normaler und pathologischer Seren erklären. In diesem Zusammenhang interessiert daher die Feststellung, daß bestimmte Globulinanteile mancher Seren durch NaOCl überhaupt nicht angegriffen werden, und ebenso fanden sich in pathologischen Seren Albumine, die sehr viel langsamer als normales Albumin aufgespalten wurden. Hierüber werden wir später berichten. Schließlich kann die Affinität von Natriumhypochlorit zu bestimmten Gruppen des Proteinmoleküls s wohl die antiseptische Wirkung der Substanz gegenüber bestimmten Bakterien wie die geringen zellschädigenden Eigenschaften gegenüber dem Organismus bestimmen. Auch hierüber können erst weitere Untersuchungen Aufklärung geben.

Zusammenfassung.

1. Orientierende Versuche an Serumproteinen ergaben, daß die einzelnen Proteinanteile durch Hypochlorit nicht gleichmäßig angegriffen werden.

2. Bei Einwirkung einer bestimmten Menge Hypochlorit auf die Gesamtproteine entsteht ein Verlust an gasförmigem Stickstoff nur in der ersten halben Stunde. Die Aufspaltung des Proteins geht jedoch weiter, wie aus der Zunahme des sog. Rest-N zu erkennen ist.

3. Zur Klärung der Reaktionsweise von Hypochlorit mit Eiweißkörpern wurden Modellversuche an synthetischen Substraten durchgeführt. Als Maß für den Abbau dieser Substanzen diente die quantitative Erfassung von CO_2 und gasförmigen Stickstoffes in der von

O. Warburg angegebenen Apparatur. Die Untersuchungen erfolgten an Aminosäuren, Peptiden und Säureamiden.

4. Die untersuchten α-Aminosäuren wurden quantitativ decarboxyliert, wobei je nach Struktur ein bzw. 2 mol CO_2 je Mol Aminosäure entstanden. Die freien basischen Gruppen im Guanidinrest des Arginins lieferten nach Einwirkung von Hypochlorit die theoretisch mögliche Menge N_2. Auch beim Abbau von Tryptophan entstand gasförmiger Stickstoff, der sehr wahrscheinlich aus dem Indolring stammt.

5. Die Spaltung von Peptidbindungen geht in den verschiedenen Di- und Tripeptiden nicht mit gleicher Geschwindigkeit vor sich. Dies spricht dafür, daß eine verschiedene Stabilität der Peptidbindung je nach Zusammensetzung des Substrates zwischen den einzelnen Aminosäuren besteht. Für die Auslösung der Reaktion ist eine freie α-Aminogruppe notwendig.

6. Eine freie α-Aminogruppe scheint auch die Spaltung von Säureamidbindungen zu beschleunigen. Der gleiche katalysierende Effekt wird wahrscheinlich auch durch die Reaktion von Hypochlorit mit den freien basischen Gruppen im Guanidinrest des Arginins hervorgerufen.

7. Die beim Abbau von Serumalbumin durch eine bestimmte Menge Hypochlorit freigesetzten Mengen CO_2 und N_2 unterscheiden sich von denjenigen des Serumglobulins, obwohl es sich in beiden Fällen nicht um elektrophoretisch einheitliche Eiweißkörper handelte. Es wird die Möglichkeit besprochen, strukturelle Veränderungen an Serumproteinen mit Hilfe von Natriumhypochlorit nachzuweisen. Die Affinität der Substanz zu bestimmten Gruppen des Proteinmoleküls kann sowohl die antiseptische Wirkung gegenüber bestimmten Bakterien wie die geringen zellschädigenden Eigenschaften gegenüber dem Organismus erklären.

Ernst Laqueur,

geb. 7. 8. 1880, gest. 10. 8. 1947.

Am 10. August 1947 erlag Prof. Ernst Laqueur, der Begründer und durch 25 Jahre der Leiter des Pharmakotherapeutischen Instituts der Universität Amsterdam, einem Herzschlag. Mit ihm ist ein Forscher und akademischer Lehrer dahingegangen, dessen Name für immer mit der Wissenschaft von den Hormonen verbunden bleiben wird.

Laqueur stammt aus Obernigk in Schlesien, wo er am 7. 8. 1880 geboren wurde. Nach Absolvierung des Breslauer Maria-Magdalenen-Gymnasiums studierte er in Breslau und in Heidelberg, wobei frühzeitig sein großes naturwissenschaftliches Interesse und seine historisch-philosophischen Neigungen zutage traten. Bei L. Hermann, O. Weiss und M. Jaffé in Königsberg sowie bei E. Roux in Halle fand er als junger Arzt den Zugang zu wissenschaftlicher, insbesondere physiologischer Forschung, die ihn während der ersten Jahre in erster Linie fesselte. 1912 schon ging er nach Holland zu dem Physiologen Hamburger, der dem jungen Gelehrten eine Dozentur für Biologie verschaffte. Im ersten Weltkrieg erfüllte er als Militärarzt seine Pflicht, auch als Mitarbeiter an den der Militärmedizin gestellten fachwissenschaftlichen Aufgaben, wobei es sich in erster Linie um die Untersuchung der durch chemische Kampfstoffe verursachten Schäden und ihre Bekämpfung handelte.

Bald nach Beendigung des Krieges kehrte Laqueur nach Holland zurück, wo er zunächst bei Snapper in Amsterdam arbeitete, bis er 1920 die Professur für Pharmakologie an der Amsterdamer Universität erhielt. In jener Zeit trat er in Verbindung mit der später dank Laqueurs wissenschaftlicher Beratung sehr bekannt gewordenen Pharmazeutischen Fabrik Organon in Oss, eine Zusammenarbeit, die in vorbildlicher Form gezeigt hat, wie Technik und akademische Wissenschaft sich gegenseitig zu fördern vermögen ohne die geringste Konzession von seiten der rein wissenschaftlichen Forschung. Diese Zusammenarbeit verschaffte Laqueur im Jahre 1923, nachdem er sein eigenes Institut errichtet hatte, die Hilfsmittel und Hilfskräfte, die er für seine umfangreichen wissenschaftlichen Aufgaben benötigte.

Laqueur war ein ausgezeichneter Organisator wissenschaftlicher Arbeit. Wie wenige verstand er es, jüngere Forscher zu gemeinsamem Wirken an großen Aufgabengebieten zusammenzuführen, ohne ihre

wissenschaftliche Selbständigkeit und Eigenart irgendwie zu beeinträchtigen. Wer den Vorzug hatte, diesem Kreise begabter und tüchtiger Männer und Frauen eine Zeitlang angehören zu dürfen, wird die Höhe des wissenschaftlichen Niveaus, den Einklang der wissenschaftlichen Interessen, die Ruhe, Ordnung und Sicherheit des gesamten Betriebs an diesem Institut als ein Vorbild in Erinnerung bewahren. Ohne sich in Einzelheiten einzumengen, übte Laqueur doch eine stete Gesamtleitung aus, deren Einfluß sich niemand entzog oder auch nur zu entziehen wünschte. Nur so ist es zu verstehen, daß aus diesem Laboratorium, an dem ständig viele wissenschaftliche Mitarbeiter und Hilfskräfte tätig waren, eine so große Fülle systematischer Arbeiten auf dem Gebiet der Chemie, der Pharmakologie, der Biologie und der Therapie geleistet werden konnte, die größtenteils der Erforschung der Hormone, vor allem neben dem Insulin der Geschlechtshormone, dienten und die neben einer großen Zahl wichtiger Einzelbefunde eine ganze Reihe bedeutender Entdeckungen auf diesen Gebieten zuwege brachten.

1941 wurde Laqueur von der deutschen Besatzungsmacht seines Amtes enthoben. Nur mit knapper Not entging er dem Schicksal der Deportation, mußte es aber erleben, daß Tochter und Schwiegersohn nach Verschleppung in das Lager Belsen-Bergen den Tod fanden. 1945 wieder in sein Amt eingesetzt, hat Laqueur noch einmal den neuen Aufschwung seines Instituts erlebt, das dank der aufopfernden Arbeit seiner treuen Mitarbeiter durch die schwerste Zeit, wenn auch unter großen Mühen und Nöten, durchgehalten worden war. Nach mehreren großen Reisen, insbesondere nach Nord- und Südamerika, wo er nach Gebühr und Verdienst gefeiert wurde, kehrte er zurück, durch schwere Erkrankung des Herzens und eine Nierenoperation geschwächt, aber voll des alten Mutes und reich an Plänen für weitere Arbeit. Bei einem Urlaub in der Schweiz, wo er noch einmal alles Glück der Berge genoß, wurde er Zeuge eines Autounfalls. Zur Hilfe eilend, streckte ihn ein Herzschlag nieder. So ist er helfend gestorben, so wie er als Helfer im Gedenken vieler Hunderter lebt, denen er in der ersten Hitlerzeit sowie nachher während der Okkupation Hollands, obwohl selbst ständig schwer gefährdet, mit all seinen Kräften und Mitteln Existenz und Leben erhalten hat.

Wenn wir uns nunmehr dem wissenschaftlichen Lebenswerk Laqueurs zuwenden, so müssen wir zwei ganz scharf voneinander getrennte Perioden seines Schaffens feststellen. Die erste, beginnend mit seinen Jugendarbeiten in Königsberg, umfaßt die Zeit von 1902 bis 1922, die zweite, scheinbar übergangslos sich anschließend, die Periode von 1923 bis zu seinem Tode 1947. In jener ersten Phase hat Laqueur eine ganze Reihe verschiedener Probleme bearbeitet,

keines nur oberflächlich streifend, sondern fast stets in die Tiefe und Breite vordringend. Von seinen ersten Arbeiten über die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Kaseins und seiner Bildung bei der Milchgerinnung gelangte Laqueur unmittelbar in das Gebiet der Fermentlehre. Von 1906 an finden wir eine große Zahl von Untersuchungen über die Natur und die pharmakologische Beeinflußbarkeit der *Autolyse*, in der er ein des gründlichen Studiums wertes Abbild vitaler Abbauprozesse erkannte. Demgegenüber kann man die Arbeiten aus dem Gebiet der physiologischen Optik, die am Königsberger Physiologischen Institut entstanden, sowie einige entwicklungsphysiologische Arbeiten aus der Zeit in Halle bei Roux als Seitenwege betrachten, auf die er später nicht mehr zurückgekehrt ist, die aber seine Gesamtausbildung bereicherten. Eine mit F. Verzár zusammen ausgeführte Untersuchung über die spezifische Wirkung der Kohlensäure auf das Atemzentrum leitete zu einer Anzahl von Arbeiten über, die sich mit dem Einfluß von Gasen, insbesondere von Sauerstoff und Kohlensäure, auf überlebende Organe befassen und die besondere Untersuchungen über die Bewegungen des isolierten Säugetierdarmes zur Folge hatten. Aus den im ersten Weltkrieg geleisteten Arbeiten seien besonders die zusammen mit R. Magnus durchgeführten über die Pathologie und Therapie der Phosgenwirkungen am Tier erwähnt. Mit einer kurzen Abschweifung auf balneologisches Gebiet schließt die erste Epoche von Laqueurs wissenschaftlichem Werk ab.

1923 sehen wir ihn dann scheinbar unvermittelt und plötzlich bei der Arbeit am Insulin, die sogleich mit einer Serie bedeutsamer Befunde begann — Auftakt zu Laqueurs eigentlicher großer Lebensaufgabe. Für den Biographen ist diese übergangslose Wendung zu einem völlig neuen und damals noch ganz im Anfangsstadium befindlichen Gebiet nur zu verstehen aus dem für Laqueur entscheidend gewordenen Anstoß, den das Herantreten einer rein praktischen Aufgabe: die Herstellung eines industriell zu fabrizierenden Insulinpräparats, bedeutete. Nicht daß diese Aufgabe an ihn herantrat, ist das Merkwürdige, denn sie mag damals, als gerade das erste Insulin in Amerika fabrikatorisch hergestellt worden war, manchem gestellt worden sein, sondern die Art, wie Laqueur die Aufgabe meisterte, ist das Charakteristische. Die Aufgabe fand den Mann, der ihr gerecht wurde.

Bei der Darstellung der damals beginnenden Epoche großen Schaffens, die im Jahre 1941 einen vorläufigen und erzwungenen Abschluß fand, darf ich mich an die ausgezeichnete Zusammenfassung halten, die einer der ältesten und verdientesten Mitarbeiter Laqueurs, J. Freud, zur Feier von Laqueurs 60. Geburtstag über die sämtlichen Arbeiten gegeben hat, die von 1925—1940 aus dem Laqueurschen Institut

hervorgingen[1]. Es handelt sich um 698 Publikationen. Weitere 80, die seit 1940 erschienen und noch als von Laqueur inspiriert zu betrachten sind, gehören dazu. Obwohl nur 200 Arbeiten Laqueurs Namen tragen und alle übrigen unter denen seiner Mitarbeiter herauskamen, so müssen wir sie doch sämtlich als seiner Lebensarbeit zugehörig betrachten. Ihre große Zahl zwingt zum Verzicht darauf, sie mit Erscheinungsort und Titel alle aufzuführen. Ich muß auf die genannte Schrift verweisen, während die Liste der vor 1923 von Laqueur publizierten Arbeiten (etwas mehr als 50) vom Verfasser eingefordert werden kann.

Die Arbeiten über Reindarstellung und Eichung des *Insulins* eröffnen den Reigen. Sie sind seither stetig ergänzt worden, wenn sie auch zuletzt hinter den neuen Aufgaben zurücktraten. Die Sorgfalt, mit der die *Methoden der Eichung* von Insulinpräparaten bearbeitet wurden, ist kennzeichnend für ein Bestreben, das Laqueur bei all seinen späteren Hormonarbeiten leitete: den Ausbau zuverlässiger Nachweis- und Bestimmungsmethoden als Grundlage jeder eingehenden Forschung von Anfang an sicherzustellen. Auf solcher Vorarbeit entwickelte sich nicht nur die stetig weiter getriebene Reinigung der Insulinpräparate sondern auch das Studium ihrer Empfindlichkeit gegenüber Einwirkungen der verschiedensten Art sowie über den Einfluß, den die Art der Zufuhr für die Wirkung des Insulins hat.

Es versteht sich von selbst, daß die Analyse der unter Insulin sich abspielenden Veränderungen des *Kohlenhydratstoffwechsels* in zahlreichen Arbeiten des Laqueurschen Instituts weitgehend gefördert wurde. Insbesondere mußte das Schicksal des Glykogens interessieren, und auch das viel erörterte Problem des im Blut kreisenden sog. gebundenen Zuckers fand Berücksichtigung.

Noch während die Insulinarbeiten, die allgemeine Anerkennung fanden, weitergingen, begann Laqueur die systematische Erschließung eines Gebietes, dessen Erforschung noch ganz im Anfang stand und ebenso schwierig als wichtig erschien: das Studium der Geschlechtshormone, ihrer Reindarstellung, ihrer chemischen Identifizierung und all ihrer mannigfachen physiologischen Wirkungen. Die Reindarstellung des als *Menformon* bezeichneten brunsterzeugenden Hormons aus Follikelflüssigkeit und aus dem Harn schwangerer Frauen, sowie die Ausarbeitung adäquater Eichungsmethoden, die zur Schaffung eines internationalen Standardpräparats führten, leiteten über zur Erforschung des biologischen Verhaltens und der mikroskopisch feststellbaren Wirkungen auf das Ovarium. Die chemischen Arbeiten, besonders getragen von E. Dingemanse und K. H. David, deckten eine steigende Zahl menformonähnlich wirkender östrogener Stoffe auf,

[1] Freud, J.: Acta brevia neerland. **10**, 1 (1940).

nachdem der Harn trächtiger Stuten sich als besonders reich an Substanzen dieser Gruppe und als Ausgangsmaterial zu ihrer Darstellung erwiesen hatte. Oestron, Oestradiol, Oestriol, Equilenin usw. wurden eingehend chemisch und biologisch durchuntersucht. Die Entdeckung *östrogener Stoffe im männlichen Harn* erregte berechtigtes Aufsehen und eröffnete ganz neue Gesichtspunkte und Ausblicke. Die Darstellung östrogener Stoffe aus dem Harn wurde zu einer Kunst entwickelt, und ihr Nachweis ist in den letzten Jahren besonders durch E. Dingemanse zu einer kolorimetrischen Methode für die getrennte Bestimmung der verschiedenen Sterone erweitert worden. Frühzeitig konnte das Vorkommen weiblicher Geschlechtshormone im Blut und anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die Harnanalyse gewann große klinische Bedeutung.

Es ist nicht möglich, die Fülle von Arbeiten zu referieren, die vor allem durch S. E. de Jongh und J. Freud der Klärung der biologischen Wirkungen unter Verwendung mikroskopischer und experimenteller Methoden dienten. Die Art, wie hier alle fundamentalen Fragen gestellt und experimentell gelöst wurden, bleibt ein Ruhmestitel des Laqueurschen Instituts, seines Leiters wie seiner Mitarbeiter. Allein das bedeutende Problem der *antimaskulinen und paradoxen Wirkung* der Östrogene, im Laqueurschen Arbeitskreise entdeckt, wurde in vielen Arbeiten behandelt und geklärt.

Diese Studien stehen zum Teil schon unter dem Einfluß der Entdeckung des männlichen Geschlechtshormons, des *Testosterons*, dessen Reindarstellung und Konstitutionsermittlung K. G. David glückte. Die Studien zu seiner Charakterisierung, Eichung und Unterscheidung von den im Harn ausgeschiedenen männlichen Hormonen führten zu bedeutenden Resultaten. Der Hahnenkammtest, ständig weiter verbessert, bewährte sich vorzüglich und erschloß eigentlich erst das Studium dieses Gebiets in vollem Umfang. Frühzeitig wurde erkannt, daß die Wirkung des Testosterons durch eine Begleitsubstanz wesentlich verstärkt wird, deren Identifizierung in zahlreichen Arbeiten von Freud und Dingemanse erstrebt wurde und die sich schließlich als eine ungesättigte Fettsäure kennzeichnen ließ. Das dank der kolorimetrischen Methoden erleichterte Studium der Ausscheidung der Diketosteroide bei Krankheiten verschiedener Art führte unter anderem zu der Entdeckung ihrer vermehrten Ausscheidung bei Hypernephromen, was auch diagnostisch von Wichtigkeit ist. Die eigentümlichen Veränderungen, die der Hahnenkamm bei direktem Aufbringen von männlichem Geschlechtshormon zeigt, gaben Anlaß zu genaueren histologischen Studien. An die wichtige Entdeckung, daß weibliche Tiere durch Behandlung mit Testosteron maskulinisiert werden, schlossen sich Untersuchungen an, die später zu dem Versuch führten, die

Prostatahypertrophie mit Testosteron zu behandeln, ein Verfahren, das sich vor allem bei den Anfangsstadien dieser Erkrankung sehr bewährt hat.

Die nahen chemischen Beziehungen zwischen den Geschlechtshormonen und denen der Nebennierenrinde, wie sie aus Reichsteins Arbeiten bekannt wurden, gaben Anlaß zu ausgiebigen Untersuchungen über die Wirkungen des Cortins und, aus praktischen Gründen, zur Ausarbeitung eines Ermüdungstestes zur Eichung von Nebennierenrindenpräparaten. Eine größere Zahl von Arbeiten trug Wesentliches zur Kenntnis der adrenopriven Zustände bei.

Während die Zahl der Arbeiten, die sich mit der *Schilddrüsenwirkung* befassen, zunächst zurücktrat, haben spätere Untersuchungen ihre Bedeutung für das Wachstum ans Licht gebracht. Diese Arbeiten standen in innerem Zusammenhang mit dem Forschungsgebiet, das besonders im letzten Jahrzehnt des Laqueurschen Schaffens mit großem Erfolg bearbeitet wurde, nämlich die Trennung und Reinigung der *Hypophysenhormone* und die genauere Analyse ihrer Wirkung.

Wieder wurden neu geschaffene Methoden der Eichung für den Erfolg entscheidend. Die Methode der Messung des Rattenschwanzwachstums im Röntgenbild erleichterte wesentlich die Reinigung des *Wachstumshormons*. Es gelang, eine Einheit auf nur 10 γ Substanz zu reduzieren. Die chemische und physikalische Charakterisierung solcher Produkte wurde durchgeführt und der Angriffspunkt der Wirkung genauer festgelegt. Vorstöße nach verschiedener Richtung führten unter anderem zur Erzeugung von Riesenwuchs im Tierversuch und zu Einsichten in die Beziehungen zwischen Wachstums- und *thyreotropem Hormon*.

Auch dieses Hormon wurde weitgehend gereinigt unter Verwendung neuer Testmethoden, die auf der histologischen Prüfung der Schilddrüsen von Meerschweinchen und hypophysenlosen Mäuse beruhen.

Hinsichtlich des *gonadotropen Hormons* der Hypophyse wurde eine früh von Laqueur geäußerte Vermutung, daß es nicht identisch sei mit dem aus Harn gewonnenen, in einer Reihe von Arbeiten als richtig erwiesen. Seine Reinigung wurde bis auf nur 1 γ je Einheit gebracht; S. E. de Jongh baute die Wirkungsanalyse aus.

Die Beziehungen des gonadotropen Hypophysenhormons zur Aschheim-Zondekschen Reaktion wurden geklärt. Ein antagonistischer Effekt des gonadotropen Hormons gegenüber gewissen Wirkungen der östrogenen Hormone, wie überhaupt die Beziehungen zwischen den Wirkungen der beiden Hormongruppen wurden eingehend untersucht und das Verhalten der aus verschiedenen Quellen stammenden Hormone vergleichend geprüft. Aus den diese Untersuchungen begleitenden histologischen Studien gewann J. Freud neue Einsichten in

die beim Zyklus der Ratte ablaufenden Vorgänge und ihre hormonale Regulierung.

Die *Beziehungen zwischen Hypophyse und Stoffwechsel*, vor allem dem *Kohlenhydratstoffwechsel*, erfuhren wiederholte Bearbeitung, wobei zugleich die Einflüsse der Nebennieren auf diese Stoffwechselvorgänge Berücksichtigung fanden.

Die vor allem von de Jongh angeregten und durchgeführten Arbeiten über die hormonalen Bedingungen der *Laktation* und über die damit nahe verbundenen Wirkungen auf den Gang der Trächtigkeit wurden durch biologische Studien von J. Freud, Ina E. Uyldert und K. G. David wesentlich ergänzt. Die Folgen der Hypophysektomie wurden, abgesehen von den schon erwähnten Arbeiten, in einer großen Zahl von Untersuchungen systematisch studiert, wobei neben stoffwechselchemischen Befunden mikroskopisch-histologische eine wesentliche Rolle spielten.

Zahlreiche Einzeluntersuchungen gruppieren sich um die Hauptthemen. So finden sich Arbeiten über die Uterusbewegungen in Abhängigkeit von hormonalen Faktoren, zur Frage der Beziehung zwischen Vitamin E und gonadotropem Hormon und eine Reihe von Beiträgen zur Verbesserung operativer experimenteller Methoden, zur Technik der Stoffwechselmessung am Tier usw.; Sonderpublikationen wie die Studien zur Wirkungsbestimmung antianämischer Leberpräparate, spezielle pharmakologische Untersuchungen wie über Nikotin und Bulbokapnin, chemotherapeutische Versuchsreihen mit gewissen neuen Akridin- und Chininderivaten, Vitaminstudien — diese und zahlreiche andere gelegentliche Arbeiten beweisen, daß Laqueur und seine Mitarbeiter trotz der Beanspruchung durch ihre Hauptaufgaben noch Zeit zur Bearbeitung anderer Fragen fanden. Laqueur speziell hat darüber hinaus in zahlreichen Vorträgen, Referaten, Artikeln und Beiträgen immer wieder sich bemüht, die Ergebnisse der Hormonforschung weiteren Kreisen bekannt und verständlich zu machen.

Die Liste der nach Laqueurs Tode von seinen alten Mitarbeitern herausgebrachten Arbeiten zeigt, wie die Saat, die er säte, weiter Frucht trägt. Sie alle haben, ihren eigenen Weg verfolgend und doch im Geist des verstorbenen Lehrers wirkend, am Fortschritt der Erkenntnis hormonaler Wirkungen mit Erfolg weitergearbeitet mit all der Vielseitigkeit der Problematik, der Mittel und der Methoden, die durch Laqueur zum Charakteristikum des Pharmakotherapeutischen Instituts geworden sind. Man darf zuversichtlich hoffen, daß diese Stätte erfolgreichster wissenschaftlicher Hormonforschung in der ihr durch Laqueur gegebenen Prägung weiter erhalten bleibt, dem Begründer und Meister als dauerndes Denkmal.

Otto Riesser, Frankfurt a. M.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Lund, Schweden.

Intraperitoneale Transplantation von Mäusekarzinomen, eine Methode zur Erzeugung infiltrierender und metastasierender Tumoren*.

Von

Ernst Wollheim.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Februar 1948.)

Für manche Probleme der experimentellen Krebsforschung — beispielsweise für das Studium der Karzinogenese und vor allem für eine befriedigende Untersuchung etwaiger die Tumorentstehung hemmender Faktoren — ist eine Methode erwünscht, durch die den menschlichen Karzinomen ähnliche, infiltrierend wachsende und metastasierende Tumoren serienmäßig in beliebiger Anzahl erzeugt werden können. Für die Analyse pharmakologischer Effekte ist es außerdem wesentlich, daß die Versuchsresultate in relativ kurzer Zeit zu beurteilen sind. Diesen Anforderungen sucht das hier vorgelegte Verfahren der intraperitonealen Transplantation von Mäusekarzinomen zu genügen.

Die bisher angewandten Methoden erlauben im kurzfristigen Versuch an großen, statistisch auswertbaren Versuchsreihen nur die Erzeugung eines isolierten, nicht metastasierenden Tumors. Dies gilt für die transplantablen Karzinome und Sarkome bei der üblichen subkutanen Inokulation (Übertragung von Tumorstückchen oder -suspensionen). Die so induzierten Tumoren zeigen überdies eine nicht unerhebliche, störende Tendenz zur Spontanregression. Die durch die verschiedenen kanzerogenen Stoffe chemisch ausgelösten Tumoren metastasieren ebenfalls nur selten. Arbeitet man aber mit Spontankarzinomen an Mäusen, so werden große besondere Tierstämme mit hoher Tumorfrequenz gebraucht, und die Beobachtungszeit einer Versuchsserie erstreckt sich über 1—2 Jahre.

Die verschiedenen transplantablen Karzinome und Sarkome wurden bisher fast ausschließlich subkutan übertragen (Hanau, Morau, Jensen, Haaland, Bashford, Ehrlich u. a.). A priori war anzunehmen, daß auch die Inokulation der Tumoren in Körperhöhlen oder Organe möglich wäre. Merkwürdigerweise wurden aber nur relativ wenige Bemühungen in dieser Richtung unternommen, so von Sticker (intraperitoneale Überimpfung eines Lymphosarkoms in einigen Versuchen am Hund) und von Michaelis (Angehen eines Mäusekarzinoms bei 1 von 7 geimpften Mäusen nach intraperitonealer Übertragung). Bashford, Murrey und Bowen gaben die intraperitoneale Überimpfung zu Gunsten der subkutanen auf, „da häufig sekundäre Geschwülste innerhalb des Peritoneums auftraten ...“ Bei der intraperitonealen Inokulation eines Rattensarkoms entstanden infiltrierend wachsende und metastasierende Tumoren (Flexner

* Gustav von Bergmann zum 70. Geburtstag gewidmet.

und Jobling). Nach der Implantation eines Mäusekarzinoms in die Magenwand fand Citron an einigen Tieren infiltrierend wachsende, metastasierende Tumoren. Die intravenöse Injektion von Tumorsuspensionen ergab an Mäusen Lungenkarzinome, aber mit so großer Mortalität, daß größere Versuchsreihen undurchführbar waren (Fiedberger). Keysser injizierte in steriler Operation Mäusen Karzinomsuspensionen in verschiedene Organe der Bauchhöhle (Leber, Niere) und in das Auge. Es entwickelten sich infiltrierende und metastasierende Tumoren. Das relativ komplizierte Operationsverfahren läßt nicht die gleichzeitige Transplantation größerer Versuchsserien zu, und fand keine weitere Beachtung. Nach der intraperitonealen Injektion einer Aufschwemmung von Flexner-Jobling-Tumor beobachtete Hesse bei einem kleinen Tiermaterial an 40—80% der geimpften Ratten eine Peritonitis carcinomatosa mit hirsekorngroßen Abklatschtumoren, aber kein infiltratives Wachstum und Metastasen außerhalb der Bauchhöhle. In Weiterführung dieser Versuche an einer kleinen Anzahl von Mäusen sahen Loewenthal und Jahn 10—14 Tage nach der intraperitonealen Injektion eines Ehrlich-Karzinoms ihre Tiere an Peritonitis carcinomatosa mit Aszites, aber ohne infiltratives Wachstum in die Organe der Bauchhöhle und ohne Metastasen außerhalb des Abdomens, zugrunde gehen. Das gleiche Bild ergab sich nach der Injektion von tumorzellenhaltigem Aszites. Dieser Aszitestumor wurde gelegentlich in späteren Versuchen benutzt (z. B. Lettré).

Das hier zu beschreibende Verfahren unterscheidet sich in seinen Resultaten und teilweise auch methodisch von den erwähnten älteren Versuchen.

Methode.

Tiermaterial. Die Versuche wurden an weißen Mäusen eines seit fast 3 Jahren in Inzucht rein gezüchteten Stammes ausgeführt. Die Frequenz an Spontantumoren ist bei diesem Stamm sehr niedrig, maximal etwa 3—4 pro mille. Für die Versuche wurden mindestens 2 Monate alte Tiere benutzt. Das Mindestgewicht der ♂ soll 19—20 g, das der ♀ 16—17 g sein. Je 20 Tiere werden immer zu einer Serie zusammengefaßt. Einige Serien enthielten mehr als 20 Mäuse. Kleinere Serien sollten nicht angelegt werden, da ihre Beurteilung unsicher wird. Im Hinblick auf andere Untersuchungen, die mit dieser Methode durchgeführt wurden (Wollheim), wurden jeweils nur Tiere gleichen Geschlechtes in einer Serie zusammengefaßt. Je 3 Tiere wurden in einem gemeinsamen Mäuseglas gehalten. Ihre Ernährung geschah durch ein spezielles „Mäusebrot" folgender Zusammensetzung: in 100 kg sind enthalten 50 kg Milch, 26,5 kg gewürzfreie Brotkrümel, 10 kg Haferschrot, 7,5 kg Weizenkeimlinge, 5 kg Luzernenheumehl, 1,25 kg Fleischmehl und 20 g Oel. Neben diesem Brot brauchen die Tiere nur Wasser.

Einige orientierende Versuchsreihen wurden auch mit Mäusen der gleichen Rasse durchgeführt, die bereits geboren hatte, sowie mit Mäusen einer schwarzgrauen Mischrasse.

Der verwendete Tumor. Transplantiert wurde das Karzinom 2146 der Imperial Cancer Research Laboratories, London, denen für die Überlassung des Tumors unter schwierigen Kriegsumständen auch an

dieser Stelle wärmstens gedankt sei. Dieser Tumor — histologisch ein stark anaplastisches Karzinom mit zahlreichen Mitosen — zeigte seit November 1944, also seit mehr als $2^1/_2$ Jahren, in 67 Passagen eine annähernd gleichbleibende Aktivität. Bei der üblichen subkutanen Transplantation ergab sich:

Anschlagsfrequenz bei subkutaner Inokulation des Tumors:

Juli 1945 bis März 1946: 16 Serien = 320 ♂ Mäuse: $98 \pm 0{,}8\%$ ($\sigma = 3{,}1$)
16 Serien = 320 ♀ Mäuse: $96 \pm 1{,}0\%$ ($\sigma = 3{,}9$)
April 1946 bis Juli 1947: 25 Serien = 500 ♂ Mäuse: $98 + 1{,}0\%$ ($\sigma = 5{,}2$)
16 Serien = 320 ♀ Mäuse: $94 \pm 1{,}2\%$ ($\sigma = 5{,}0$)

Die 2 Monate nach der subkutanen Inokulation des Tumors überlebenden Tiere sind in der Regel frei von Tumoren. Die Differenz zwischen der Anschlagsfrequenz (positive Treffer in Prozent der geimpften Tiere) und Mortalität 2 Monate nach der Inokulation in Prozent gibt das Ausmaß der Spontanregression an.

Mortalität, 2 Monate nach der subkutanen Inokulation des Tumors:

30 Serien = 600 ♂ Mäuse: $76 \pm 2{,}1\%$ ($\sigma = 11{,}6$)
21 Serien = 420 ♀ Mäuse: $72 \pm 1{,}5\%$ ($\sigma = 6{,}9$)

Es handelt sich also um einen Tumor, bei dem seit Jahren in den verschiedenen Passagen 90—100% positive Treffer auftreten. Die Tendenz zur Spontanregression beträgt im Durchschnitt etwa 25% der vorher positiven Tiere. Sie kann aber auch bei einer Anschlagsfrequenz von z. B. 95% in einzelnen Serien weit größer, bis zu 55%, sein. Dies geht aus der im Vergleich zur Anschlagsfrequenz bei der Mortalität erheblich größeren Standardabweichung hervor.

Die Inokulationstechnik. Die intraperitoneale Transplantation erfolgt (wie die übliche subkutane) durch Einführung von 1 oder 2 stecknadelkopfgroßen Tumorstückchen, die in physiologischer NaCl-Lösung in einen Troikart aufgezogen werden. Das Tumormaterial muß, entsprechend den bekannten Regeln für die subkutane Transplantation, steril behandelt werden und nicht nekrotischen Tumorpartien entstammen. Bei dem hier benutzten Tumor sind 15—25 Tage alte Tumoren zu übertragen. Für die Einführung des tumorbeschickten Troikarts wird die Haut dicht über der Symphyse durch einen Scherenschnitt etwas lateral der Medianlinie in 0,5—1,0 mm Länge gespalten. Durch diese Öffnung wird der Troikart subkutan kranialwärts 1—2 cm vorgeschoben und dann möglichst median durch die Muskulatur in die Bauchhöhle vorgestoßen. Das Tumormaterial wird dann durch Vorschieben des Mandrains in die Bauchhöhle eingeführt und der Troikart rasch zurückgezogen. Die Hautwunde wird durch den Finger zusammengedrückt. Alle Instrumente sind sterilisiert.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Eingriff sterben 0—5% der geimpften Tiere an Darmprolaps oder Operationsfolgen. Die Versuchsserien von je 20 Mäusen werden also zweckmäßig erst 24 Stunden nach der Inokulation zusammengestellt und jeweils etwa 5% mehr Tiere geimpft, als für die beabsichtigten Versuchsreihen notwendig sind.

Auswertung der Versuchsresultate. Die Versuchstiere werden erstmalig eine Woche nach der Transplantation durch Palpation des Bauches auf die Entwicklung von Tumoren untersucht. In den folgenden 3—4 Wochen wird die Untersuchung zweimal wöchentlich wiederholt, um die Anzahl der positiven Treffer, die prozentuale Anschlagsfrequenz registrieren zu können. Von der dritten Versuchswoche an beginnen die tumorbehafteten Tiere zu sterben, so daß eine Kurve der prozentualen Mortalität aufgezeichnet werden kann. Bei der Sektion der verstorbenen Tiere wird die Anzahl und Verteilung der Tumoren registriert, sowie eventuell Material zur histologischen Untersuchung entnommen. Die Bestimmung der Tumorgröße erscheint unsicher, da die Tumoren infiltrierend wachsen (s. weiter unten). Je nach der besonderen Fragestellung wird entweder der Versuch 30 bis 35 Tage nach der Impfung mit der Tötung und Sektion der dann noch überlebenden Versuchstiere beendet, oder die weitere Überlebenszeit der restlichen Versuchstiere beobachtet.

Die Versuchsergebnisse, also Anschlagsfrequenz, Mortalität, Anzahl und eventuell Lokalisation der Tumoren (z. B. Metastasen im Thorax), werden in jeder Versuchsserie von mindestens 20 Mäusen prozentual berechnet. Sollen Einflüsse auf die Anschlagsfrequenz, das Tumorwachstum oder therapeutische Probleme studiert werden, gilt für die intraperitoneale Tumortransplantation die gleiche Regel, wie für andere Transplantationsverfahren (vgl. Cramer); es sind stets von dem gleichen Impfmaterial unter gleichen Bedingungen entsprechende Kontrollserien anzulegen. Der Vergleich der Versuchsresultate hat nur mit diesen zu erfolgen. Nach Durchführung der für die Fragestellung notwendigen Anzahl von Serien kann das gewonnene Versuchsmaterial in üblicher Weise statistisch behandelt werden.

Ergebnisse.

Dies Verfahren der intraperitonealen Übertragung eines Mäusekarzinoms wurde bisher an 791 normalen Mäusen geprüft. 23 Passagen des Tumors wurden durchgeführt. Das Versuchsmaterial besteht aus 374 männlichen Tieren, eingeteilt in 17 Serien, und 417 weiblichen Tieren in 19 Serien.

Anschlagsfrequenz. Bei der ersten Untersuchung, 7 Tage nach der Inokulierung des Karzinoms lassen sich bei 75—90% der Tiere ein oder mehrere harte Tumoren im Abdomen palpieren. 10—14 Tage nach der Transplantation wird die maximale Anschlagsfrequenz erreicht. Sie beträgt im Mittelwert aller 36 Serien: $92 \pm 0{,}6\%$ ($\sigma = 3{,}7$). Aufgeteilt nach dem Geschlecht der Versuchstiere ergibt sich im einzelnen (vgl. Abb. 1):

Anschlagsfrequenz.

17 Serien = 374 ♂ Mäuse: 86—95%. Mittelwert 91 ± 0,6% ($\sigma = 2,6$)
19 Serien = 417 ♀ Mäuse: 85—100%. Mittelwert 92 ± 1,0% ($\sigma = 4,5$)

Die prozentuale Zahl der positiven Treffer liegt also nur um wenige Prozent unter der bei subkutaner Transplantation des gleichen Tumors

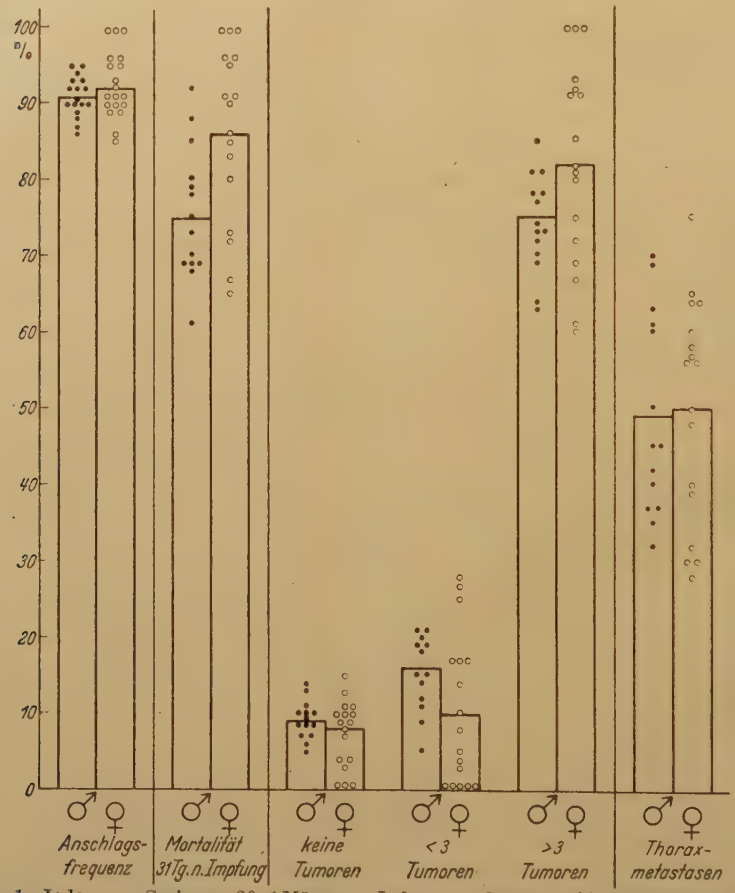


Abb. 1. Jeder • = Serie von 20 ♂ Mäusen. Jeder o = Serie von 20 ♀ Mäusen. Stäbe = Mittelwerte der Serien ♂ bzw. ♀ Mäuse. 1. Prozentanzahl positiver Treffer — Anschlagsfrequenz. 2. Prozent Mortalität, 31 Tage nach der Tumorinokulation. 3. Sektionsbefunde: a) Prozentanzahl der Tiere ohne Tumoren, b) Prozentanzahl der Tiere mit < 3 Tumoren, c) Prozentanzahl der Tiere mit > 3 Tumoren. 4. Prozentanzahl der Tiere mit Metastasen im Thorax.

erreichten (s. oben S 126). Es besteht kein Unterschied der Geschlechter.

Mortalität. Etwa mit dem Beginn der dritten Woche nach der Impfung beginnen in zunehmender Anzahl Versuchstiere mit großen

und zahlreichen Tumoren zu sterben. Die Mittelwerte der prozentualen Mortalität sind für die männlichen Serien: am 21. Tage nach der Inokulation 57%, am 28. Tage 69%, am 31. Tage 75 $\pm$ 2,3% (σ = 8,7). Für die weiblichen Serien ergibt sich ein Mittelwert von 66% am 21. Tage, von 77% am 28. Tage und von 86 $\pm$ 2,8% (σ = 11,5) am 31. Tage.

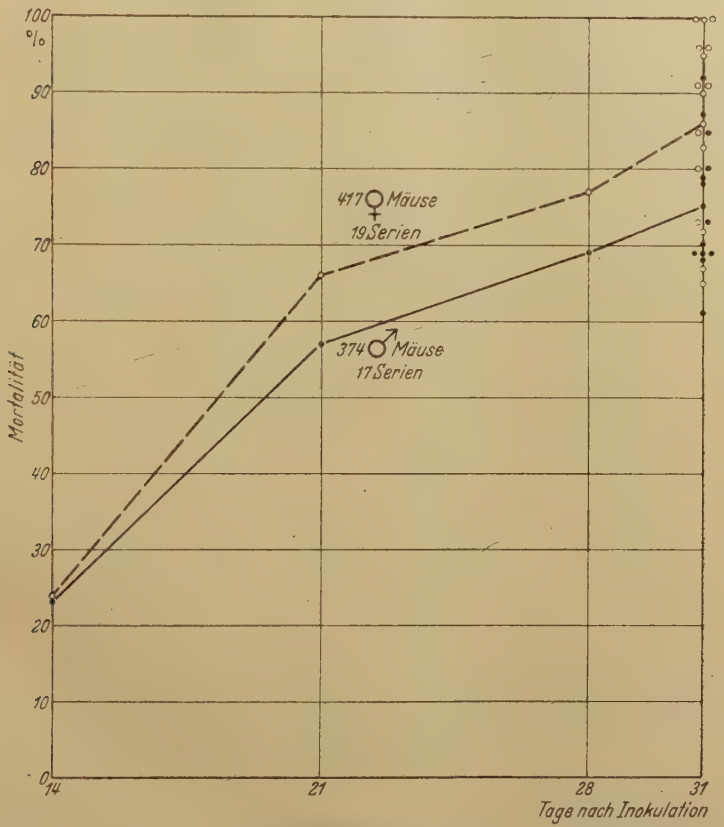


Abb. 2. Jeder • = Serie von 20 ♂ Mäusen. Jeder o = Serie von 20 ♀ Mäusen. —— Mortalitätskurve, Mittelwerte aller ♂ Serien, – – – – Mortalitätskurve, Mittelwerte aller ♀ Serien.

Der für alle Serien an diesem Tage zu bestimmende Mittelwert ist 81 $\pm$ 2,1% (σ = 11,6). In der fünften Versuchswoche überleben also, außer den tumorfreien, negativen Tieren, in jeder Serie nur wenige oder überhaupt keine tumorbehafteten Mäuse (im Durchschnitt aller Serien etwa 10%).

Die Mortalitätskurve (s. Abb. 2) der weiblichen Mäuse steigt stärker an als die der aus männlichen Tieren gebildeten Serien. Am Endwert, 31 Tage nach der Impfung, ergibt sich für die weiblichen

Serien ein um 11% höherer Mittelwert der Mortalität im Vergleich zu den männlichen Serien. Dieser Unterschied ist als statistisch signifikant anzusehen.

Die 5—6 Wochen nach der Inokulation überlebenden Mäuse wurden getötet, um die Untersuchungsergebnisse der Palpation durch die Obduktion überprüfen zu können. Die Anzahl dieser Tiere wäre zu klein gewesen, um über die Frage einer möglichen Spontanregression eine sichere Aussage zu machen. Sollte aber bei den intraperitoneal implantierten Tumoren überhaupt eine Spontanregression vorkommen, so kann sie in keinem Fall mehr als im Durchschnitt 10% aller Tumorbehafteten Mäuse betreffen. Ihre Häufigkeit würde also höchstens $^1/_3$ oder $^1/_4$ der bei subkutaner Transplantation des gleichen Tumors zu beobachtenden betragen können.

Anzahl und Verteilung der Tumoren (Sektionsbefunde). Vom 10. Tage nach der Impfung an entwickelt sich bei mehr als 50% der Tiere ein Aszites, der sich bei der Obduktion meist hämorrhagisch, seltener ikterisch verfärbt erweist. Zuweilen werden frische Blutungen in die Bauchhöhle aus Tumoren als Todesursache gefunden.

Die Bestimmung der Anzahl der bei der Sektion zu findenden Tumoren ergibt für das gesamte Tiermaterial in allen beobachteten Serien:

Kein Tumor (negativ):	0— 14%,	Mittelwert $8 \pm 0{,}7\%$	($\sigma = 3{,}9$)
1—3 Tumoren:	0— 28%,	Mittelwert $13 \pm 1{,}6\%$	($\sigma = 8{,}8$)
$>$ 3 Tumoren:	60—100%,	Mittelwert $79 \pm 2{,}0\%$	($\sigma = 11{,}1$)

Aufgeteilt nach dem Geschlecht der Versuchstiere ergibt sich in den einzelnen Serien:

Kein Tumor (negativ):	♂ Mäuse:	5— 14%,	Mittelwert $9 \pm 0{,}7\%$	($\sigma = 2{,}5$)
	♀ Mäuse:	0— 15%,	Mittelwert $8 \pm 1{,}1\%$	($\sigma = 4{,}7$)
1—3 Tumoren:	♂ Mäuse:	5— 28%,	Mittelwert $16 \pm 1{,}5\%$	($\sigma = 5{,}8$)
	♀ Mäuse:	0— 28%,	Mittelwert $10 \pm 2{,}4\%$	($\sigma = 10{,}0$)
$>$ 3 Tumoren:	♂ Mäuse:	64— 85%,	Mittelwert $75 \pm 1{,}5\%$	($\sigma = 5{,}8$)
	♀ Mäuse:	60—100%,	Mittelwert $82 \pm 3{,}2\%$	($\sigma = 13{,}3$)

Annähernd 80% aller intraperitoneal geimpfter Mäuse haben also $>$ 3, meist eine weit größere Anzahl von Tumoren (6—22). Über die Verteilung der Tumorhäufigkeit in den einzelnen Serien unterrichtet Abb. 1.

Die weiblichen Mäuse scheinen eine etwas größere Tendenz zur Metastasierung zu zeigen, als die männlichen Tiere. Der um 7% höhere Mittelwert in der Kategorie „$>$ 3 Tumoren" darf als gerade eben signifikante Differenz angesehen werden (wahrscheinlicher Fehler weniger als 10%).

Bei fast allen Tieren findet sich an der Einführungsstelle des Troikarts in die Bauchhöhle ein kirschkern- bis kirschgroßer Tumor.

Dieser „Primärtumor" wächst vom Peritoneum infiltrierend in die Bauchmuskulatur und die anderen Schichten der Bauchdecke ein, wie die histologische Untersuchung zeigt (Abb. 3). Die anderen gefundenen Tumoren sind stecknadelkopf- bis kirschkerngroß, zuweilen erreicht

Abb. 3. Maus, gestorben 25 Tage nach intraperitonealer Tumorinokulation. Tumor am Inokulationsweg in der Bauchwand („Primärtumor"). Infiltrierendes Wachstum. Vergrößerung 75fach. Färbung: Hämatoxylin-Eosin.

ein Tumor etwa die Größe einer Kirsche. Diese „metastatischen" Tumoren können an allen Organen der Bauchhöhle, auch an den Becken- und retroperitonealen Organen gefunden werden. Nur die Milz zeigte in keinem Fall einen Tumor. Die häufigsten Lokalisationen im Abdomen sind: das Mesenterium, die Leberpforte, von wo die Tumoren in die Leber destruierend einwachsen, die pylorische Region des Magens, oft mit Umwachsung des Pylorus und Bildung einer Pylorusstenose. An der Leber wird außer den von der Porta hepatis oder anderen Stellen der Oberfläche einwachsenden Tumoren auch das

Auftreten intrahepatischer Tumormetastasen beobachtet. Vom Peritonealüberzug des Zwerchfells wachsen Tumoren in die Zwerchfell-

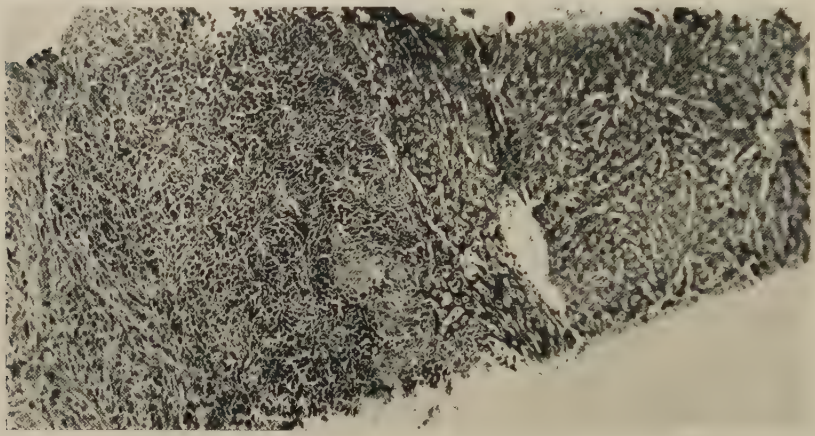


Abb. 4. Maus, gestorben 25 Tage nach intraperitonealer Tumorinokulation. Lebermetastase. Vergrößerung 75fach. Färbung: Hämatoxylin-Eosin.

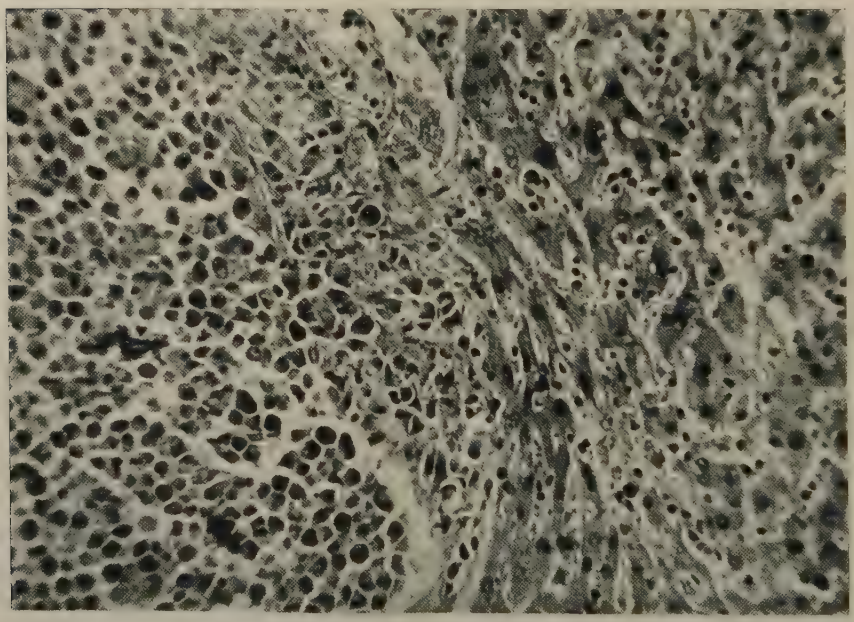


Abb. 5. Gleiches Präparat wie Abb. 4. Vergrößerung 250fach.

muskulatur ein. Oft sind auch die Nieren von Tumorgewebe umgeben, das vom Becken oder der Kapsel aus destruierend einwächst. Ebenso treten Tumoren entlang der Ureteren oder im kleinen Becken auf, wo

sie zu einer Behinderung der Harnentleerung mit Überfüllung der Harnblase, Erweiterung der Ureteren und des Nierenbeckens führen können.

Um einen zahlenmäßigen Begriff von einer bestimmten, wichtigen Tumorlokalisation zu gewinnen, wurde die Anzahl der Tiere in den

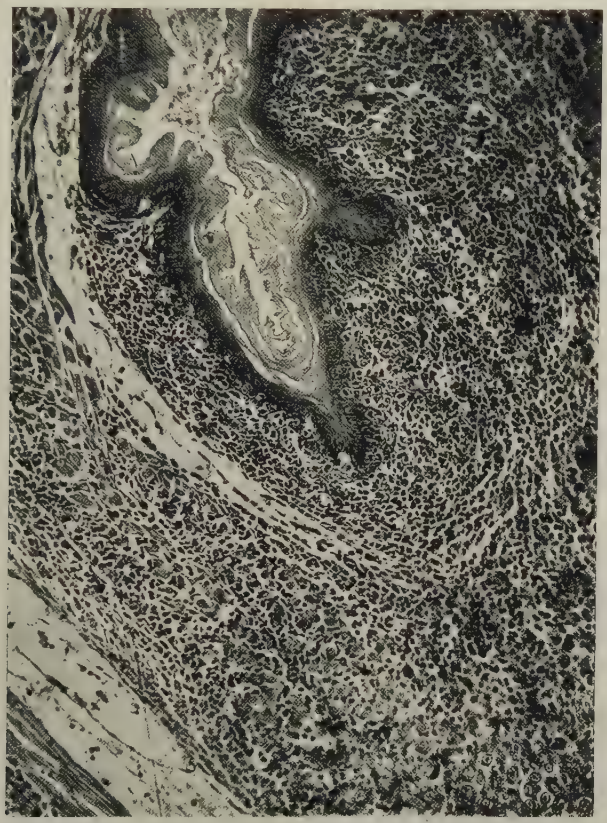


Abb. 6. Maus, gestorben 20 Tage nach intraperitonealer Tumorinokulation. Metastase in einem mediastinalen Lymphknoten, in den Ösophagus einbrechend. Vergrößerung 75fach. Färbung: Hämatoxylin-Eosin.

einzelnen Serien registriert, bei denen in die Leber einwachsende Tumoren oder intrahepatische Lebermetastasen gefunden wurden.

Anzahl der Lebertumoren:

Mittelwert aller Serien	$68 \pm 3{,}0\,\%$	($\sigma = 17{,}0$)
Mittelwert der Serien ♂ Mäuse	$60 \pm 3{,}9\,\%$	($\sigma = 14{,}5$)
Mittelwert der Serien ♀ Mäuse	$74 \pm 4{,}0\,\%$	($\sigma = 16{,}7$)

Die weiblichen Tiere zeigen damit eine signifikant größere Häufigkeit an Lebermetastasen.

Die Aussaat der Tumoren erfolgt nicht nur *intraperitoneal* und *retroperitoneal* unterhalb des Zwerchfells. Bei im Mittel $49 \pm 2{,}4\,\%$

($\sigma = 13{,}6$) der Mäuse aller Serien werden außerdem *metastatische Tumoren im Thorax* gefunden. Diese haben Stecknadelkopf- bis Schrotkorngröße. Sie sind teils in den mediastinalen Lymphknoten zu finden, von wo aus sie destruierend in die Umgebung einwachsen können, teils auf der Pleura, von wo aus sie in die Lunge vordringen,

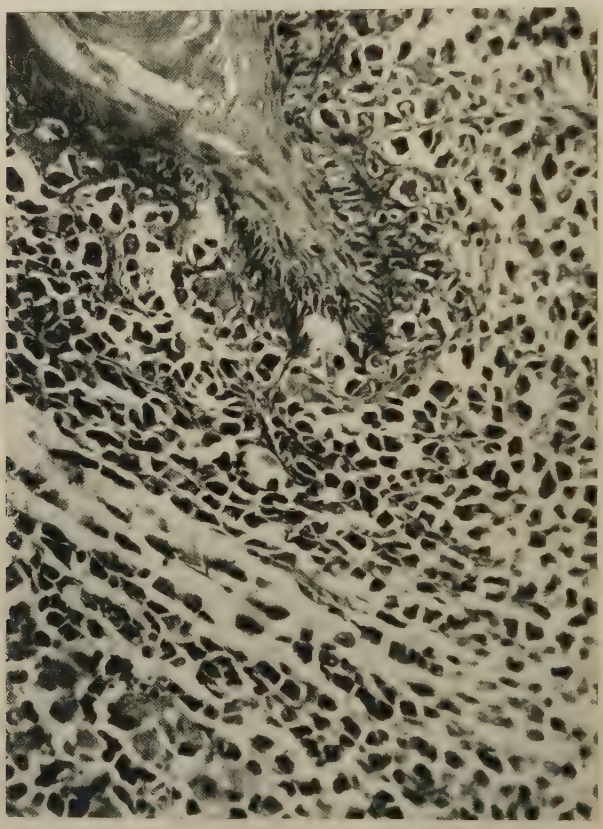


Abb. 7. Gleiches Präparat wie Abb. 6. Vergrößerung 250fach.

teils sind es von den peribronchialen Lymphwegen ausgehende Lungenmetastasen. Bei insgesamt 3 Tieren wurden stecknadelkopfgroße Tumoren auf dem Perikard beobachtet.

Die histologische Untersuchung (Prof. C. G. AHLSTRÖM) ergab bei allen untersuchten Stichproben ein gleichartiges Zellbild für alle Tumoren, „Primärtumor" und „Metastasen": ein stark anaplastisches, infiltrativ und destruierend wachsendes Karzinom mit zahlreichen Mitosen. Im einzelnen konnte das infiltrative Wachstum in der Muskulatur (s. Abb. 3), in der Leber (s. Abb. 4 und 5), im Pankreas, in den Nieren, in der Umgebung mesenterialer Lymphknoten und in der

von Thoraxmetastasen nachgewiesen werden. Abb. 6 und 7 demonstrieren das Einbrechen des karzinomatösen Gewebes von einer mediastinalen Lymphknotenmetastase in den Ösophagus.

Die an den weißen Mäusen des Inzuchtstammes beobachteten Resultate hinsichtlich der Anschlagsfrequenz, der Mortalität nach 31 Tagen, der Anzahl der Tumoren sowie der Häufigkeit von Leber- und Thoraxmetastasen wurden in gleicher Weise nach der intraperitonealen Tumortransplantation an 4 orientierenden Serien von Mäusen einer grauschwarzen Mischrasse gefunden. In keiner dieser Serien lagen die prozentuellen Werte unter den mitgeteilten Mittelwerten der weißen Mäuse gleichen Geschlechtes. Das gleiche zeigten 2 Serien von älteren weißen Mäusen der Inzuchtrasse, die bereits geboren hatten.

Diskussion.

Bei der üblichen subkutanen Inokulation eines transplantablen Mäusekarzinoms wird bekanntlich nur ein isolierter Tumor erzeugt. Metastasen in entfernte Organe kommen praktisch nicht vor. Auch bei virulenten Tumoren dringt der Tumor nur bei einer sehr kleinen Anzahl von Tieren durch direktes Einwachsen in die Bauch- oder Brusthöhle vor. Die Anschlagsfrequenz und die Anzahl der infolge von Spontanregression und Heilung überlebenden Mäuse wird wesentlich bestimmt von der benutzten Mäuserasse und von der Malignität des verwendeten Tumors. Auch bei einem recht malignen Karzinom, mit stark anaplastischem Zellbild und zahlreichen Mitosen, wie es der in diesen Versuchen benutzte Tumor 2146 der Imperial Cancer Research Lab. zeigt, ist mit einer störenden, recht erheblichen Anzahl von Spontanregressionen zu rechnen.

Bei der intraperitonealen Inokulation des gleichen Tumors an derselben Inzuchtrasse weißer Mäuse ist die Anzahl der positiven Treffer, die Anschlagsfrequenz mit 92% nur wenig niedriger als bei der subkutanen Transplantation. Dabei entstehen aber nach der intraperitonealen Impfung bei etwa 80% der Versuchstiere mindestens 3, meist eine weit größere Anzahl von Tumoren. Dies kann nicht nur auf ein besseres Gedeihen der in die Bauchhöhle eingeführten Tumorstückchen, auf das im Vergleich zum subkutanen Gewebe günstigere Milieu, zurückgeführt werden. Die Häufigkeit von retroperitonealen Tumoren und von Tumoren im Thorax (49%) zeigt, daß nicht einfach Abklatschmetastasen im Abdomen erzeugt werden, sondern daß eine echte Verschleppung, Metastasierung auf dem Lymph- oder Blutwege, erfolgt. Eine zweite wesentliche Eigenschaft dieser Tumoren ist ihr stark infiltratives und destruierendes Wachstum, das die histologischen Bilder zeigen.

Ob auch die intraperitoneal erzeugten Mäusekarzinome einer Spontanregression unterliegen und zu einer Spontanheilung führen können, läßt sich noch nicht entscheiden. Kommen aber derartige

Rückbildungen überhaupt vor, so können ihnen nur eine sehr geringe Anzahl von Versuchstieren unterliegen, da nicht mehr als im Durchschnitt 10% der geimpften und tumorbehafteten Mäuse die fünfte Versuchswoche erleben.

Für die Erzeugung derartiger infiltrierend wachsender und metastasierender Karzinome erscheint es notwendig, die Inokulation mit Tumorstückchen vorzunehmen. Bei der intraperitonealen Injektion von Tumorsuspensionen entstand in älteren Versuchen (Hesse, Loewenthal und Jahn) nur eine miliare Aussaat auf dem Peritoneum, eine Peritonitis carcinomatosa, an der die Versuchstiere (Mäuse und Ratten) rasch zugrunde gingen. Infiltratives Wachstum, intra-, retroperitoneale oder thorakale Metastasen wurden nicht beobachtet. Dagegen führte in gelegentlichen früheren Versuchen (Citron, Keysser) die Einbringung von Tumormaterial in Organe der Bauchhöhle (Magen, Leber u. a.) zu ähnlichen Bildern, wie sie hier durch die intraperitoneale Inokulation von Tumorstückchen in einfacher Weise serienmäßig erzeugt werden konnten.

Während die Anschlagsfrequenz und die Häufigkeit von Thoraxmetastasen bei den beiden Geschlechtern gleich ist, zeigte sich eine signifikant größere Mortalität der Serien weiblicher Mäuse. Diese hat ihre Ursache offenbar in einer prozentual größeren Zahl von weiblichen Tieren mit zahlreichen Tumoren, und insbesondere mit Lebermetastasen. Worauf die Eigenschaft der weiblichen Tiere beruht, eine größere Tendenz zu Metastasen im Abdomen, nicht aber im Thorax zu zeigen, kann nicht erklärt werden. Jedenfalls ist aber auf Grund dieser Befunde zu fordern, daß stets nur Versuchsserien mit Tieren des gleichen Geschlechtes angelegt und in ihren Resultaten miteinander verglichen werden.

Überblickt man die prozentuale Anschlagsfrequenz, die Mortalität 31 Tage nach der Impfung und die prozentuale Zahl von Tieren mit mehr als 3 Tumoren in den einzelnen Versuchsserien, so ergibt sich eine geringe Streuung der Resultate, ein niedriger mittlerer Fehler und eine niedrige Standardabweichung. Das Verfahren gibt also in den verschiedenen Passagen des Tumors regelmäßige und für Serienuntersuchungen verwertbare Resultate.

Gilt es Nachteile und Vorzüge des Verfahrens im Vergleich zu anderen Methoden der experimentellen Krebsforschung abzuwägen, so wird zunächst als negatives Moment anzuführen sein, daß auch hier, wie bei allen Transplantattumoren, die Karzinomzellen wirtsfremde, eingeimpfte Zellen sind, und dies mit größter Wahrscheinlichkeit auch in allen Metastasen. Dagegen erscheinen das infiltrative Wachstum und die Metastasierung, sowie der zeitlich auf weniger als 5 Wochen beschränkte Versuchsablauf als klare Vorzüge der intraperitonealen Inokulationsmethode, und dies nicht nur im Vergleich zu der

subkutanen Tumortransplantation, sondern auch gegenüber den durch kanzerogene Stoffe chemisch ausgelösten Tumoren. Denn auch bei letzteren sind Metastasen wie infiltrierendes Wachstum selten oder fehlen vollkommen, und sie zeigen zum Teil eine starke Zerfallstendenz. Zudem beträgt die Versuchsdauer bei ihnen meist 2—3 Monate. Der Zeitfaktor neben der Schwierigkeit, überhaupt Mäusestämme mit hoher Tumorfrequenz zu beschaffen, stellt einen Vorzug des Verfahrens gegenüber der Arbeit mit Mäusespontantumoren dar.

Bei der geschilderten Methode der intraperitonealen Tumorimplantation lassen sich vom gleichen zu verimpfenden Tumor leicht 120, unter günstigen Umständen bis zu 220 Mäuse gleichzeitig inokulieren. So kann an 6 oder 10 parallelen Serien unter beherrschbaren Bedingungen in weniger als 5 Wochen die Entwicklung infiltrativ wachsender und metastasierender Karzinome beobachtet werden, ein Bild, das morphologisch und in seinen klinischen Auswirkungen der menschlichen Karzinose sehr ähnlich ist. In wiederholten Serien ist ein auch statistisch befriedigendes Material zu gewinnen. Ein solches Verfahren ist besonders anwendbar, wenn in der experimentellen Krebsforschung pharmakologische oder therapeutische Probleme zu bearbeiten sind.

Zusammenfassung.

Durch die intraperitoneale Inokulation von Gewebestückchen eines transplantablen Mäusekarzinoms werden bei den Versuchstieren serienmäßig infiltrativ wachsende und metastasierende Tumoren erzeugt (Anschlagsfrequenz 92 $\pm$ 0,6%. Mäuse mit > 3 Tumoren 79 $\pm$ 2,0%). Die Metastasierung kann in alle intraperitonealen Organe mit Ausnahme der Milz, in die retroperitonealen und thorakalen Gewebe und Organe erfolgen (Thoraxmetastasen in 49 $\pm$ 2,4%). Durch das hier beschriebene Verfahren lassen sich insbesondere pharmakologische und therapeutische Probleme an einer experimentell ausgelösten metastasierenden Karzinose studieren, die dem klinischen Bild beim Menschen weitgehend gleicht.

Literatur.

Bashford, E. F., J. A. Murray u. W. H. Bowen: Z. Krebsforsch. **5**, 417 (1907). — Citron, H.: Z. Immunit.forsch. **15**, H. 1 (1912). — Cramer, W.: In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. — Ehrlich, P.: Z. Krebsforsch. **5**, 59 (1907). — Flexner u. Jobling: Zbl. Path. **18**, Nr 7 (1907). — Friedberger, H.: Berl. klin. Wschr. **1913** I, H. 7. — Haaland: Dtsch. med. Wschr. **1905** II, Nr 31. — Hanau: Fschr. Med. **7**, 321 (1889). — Hesse, F.: Zbl. Bakter. usw. I. Orig. **102**, 367 (1927). — Jensen, C. O.: Zbl. Bakter. usw. I. Orig. **34**, 28, 122 (1903). — Keysser, F.: Z. Chemother. I. Orig. **2**, 188 (1914). — Lettré, H.: Z. Krebsforsch. **37**, 439 (1932). — Loewenthal, H. u. G. Jahn: Z. Krebsforsch. **37**, 439 (1932). — Michaelis, L.: Z. Krebsforsch. **4**, 1 (1906). — Morau: Arch. méd. expér. anat. path. **6**, 677 (1894). — Sticker, A.: Z. Krebsforsch. **1**, 413 (1904). — Wollheim, E.: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 428.

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. med. F. A. Hoppe-Seyler †).

Das Verhalten der Cholinesterase des Blutserums im Kollaps nach Esmarchscher Blutleere und im traumatischen Schock*.

Von

Norbert Schümmelfeder.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. April 1948.)

Bestimmt man am narkotisierten Hund laufend im arteriellen oder venösen Blutserum während mehrerer Stunden die Höhe der Cholinesterasewerte, so ergibt sich eine bemerkenswerte Konstanz derselben. Hierfür sei aus mehreren Versuchen ein Beispiel angeführt (Methodik vgl. I. Mitteilung[1]):

22. 11. 43. Hund 41 (18,5 kg). Narkose: 9^{00}, 0,27 cm³/kg Pernocton subkutan. Blutentnahme aus der Arteria brachialis links.

Zeit	Prozenteinheiten	λ	m	%	λ	m
13^{05}	3,54	+ 0,11		103,2	+ 3,2	
13^{50}	3,41	− 0,02		99,4	− 0,6	
14^{30}	3,59	+ 0,16		104,7	+ 4,7	
15^{37}	3,32	− 0,11	± 0,04	96,8	− 3,2	± 1,1
17^{30}	3,32	− 0,11		96,8	− 3,2	
18^{00}	3,54	+ 0,11		103,2	+ 3,2	
18^{30}	3,27	− 0,16		95,3	− 4,7	
18^{45}	3,45	+ 0,02		100,6	+ 0,6	
Mittelwert	3,43			100,0		

Der mittlere Fehler m der Einzelbeobachtung wurde in üblicher Weise nach der Formel berechnet (v. Muralt[2]):

$$m = \pm \sqrt{\frac{[\lambda\lambda] - \frac{[\lambda]\,[\lambda]}{n}}{n-1}}$$

λ = Differenz der Einzelwerte vom Mittelwert, n = Anzahl der Beobachtungen.

Es ergibt sich demnach bei derartigen Messungen am narkotisierten Hund eine mittlere Fehlerbreite von ± 0,04 Prozenteinheiten oder, wenn

* V. Mitteilung der Untersuchungen über Cholinesterase im Blut nach experimentellen Schädigungen [IV. Mitt. vgl. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 626 (1947)].

[1] Schümmelfeder, N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 454 (1947). — [2] Muralt, A. v.: Einführung in die praktische Physiologie. Berlin 1944.

der Mittelwert zur Angleichung an andere Versuchsreihen mit 100% eingesetzt wird, zu ± 1,1%. Werte von Meßreihen an Tieren, welche experimentellen Schädigungen ausgesetzt wurden, führte ich in den eigenen Versuchsreihen entsprechend dem üblichen Vorgehen nur dann auf diese Eingriffe zurück, wenn sie außerhalb des dreifachen mittleren Fehlers lagen (3 m = 0,12 Prozenteinheiten, bzw. 3,4%). Selbstverständlich ist im Einzelversuch eine weitere Einengung dieser Fehlerbreite möglich, sofern vor dem Einsetzen der Schädigung wiederholt Leerwerte bestimmt werden.

Die festgestellte Konstanz der Cholinesterasewerte im Blutserum des Hundes läßt dieses Tier als besonders geeignet erscheinen, um experimentell den Einfluß von Alterationen des Organismus auf die Cholinesteraseaktivität (EA) des Blutes zu untersuchen.

Hinsichtlich der früher gefundenen Ergebnisse muß auf die vorhergehenden Mitteilungen verwiesen werden[3]. Am wahrscheinlichsten erschien mir die Annahme, es handele sich bei den Aktivitätssteigerungen um gegenregulative Vorgänge gegen depressorische (vagale) Reize. Damit würde der Cholinesterase hier eine gleiche Kreislauffunktion zukommen, wie der bekannten Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren und der einsetzenden allgemeinen Sympathikuserregung als Reaktion des Organismus gegenüber depressorischen Alterationen.

Weitere Versuche an Hunden sollten zur Klärung dieser Fragen beitragen.

A. Kollaps nach Esmarchscher *Blutleere.*

Dem Verbrennungsschock ähnliche, rasch einsetzende Kollapsformen beobachtet man nach länger dauernder Ischämie von Extremitäten. Läßt man eine Esmarchsche Blutleere länger als 3 Stunden an einer Hinterextremität bei verschiedenen Tieren bestehen, so kommt es, namentlich nach plötzlicher Wiederdurchblutung, in der Mehrzahl der Fälle rasch zum tödlichen Schock (Paolucci[4], Panella[5], Allen[6], Schwiegk[7] u. a.). Es lag daher nahe, das Verhalten der EA im Serum nach derartiger, länger dauernder Ischämie größerer Körperbezirke zu prüfen. Darüber hinaus ergeben sich durch solche Versuche weitere Einblicke in die Pathophysiologie des sog. „crush-Syndroms" (Bywaters und Beall[8]), bei welchem es auf Grund länger dauernder Kompression einer oder mehrerer Gliedmaßen nach Behebung der Durchblutungsunterbrechung zu einem fortschreitenden Versagen der Nierenfunktion kommt. Dieses Versagen der Nierenfunktion soll nach

[3] Schümmelfeder, N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 454, 466, 567, 626 (1947). — [4] Paolucci: Arch. ital. Chir. **21**, 4 (1928). — [5] Panella: Ann. ital. Chir. **14**, 1 (1935). — [6] Allen: Arch. Surg. (Am.) **38**, 115 (1938). — [7] Schwiegk, H.: Klin. Wschr. **1942 I**, 741, 765. — Schwiegk, H. u. W. H. A. Schöttler: Klin. Wschr. **1943 II**, 477. — [8] Bywaters, E. G. L. and D. Beall: Brit. med. J. **1941**, 427.

TRUETA und Mitarbeitern[9] auf einer spastischen Kontraktion der Gliedmaßenarterien beruhen, welche sich soweit zentralwärts erstreckt, daß die Nierendurchblutung in Mitleidenschaft gezogen wird.

Tierversuche.

Die Versuche wurden an 10 Hunden durchgeführt. Die Anordnung der Versuche entsprach hinsichtlich Narkose, Vorbereitung der Tiere, Blutdruckschreibung und Bestimmung der EA den bereits früher mitgeteilten Untersuchungen (s. oben). Die Auswertung jeder Blutprobe erfolgte auch hier mittels elektrometrischer Titration mindestens in Doppelbestimmungen. Für die kurvenmäßige

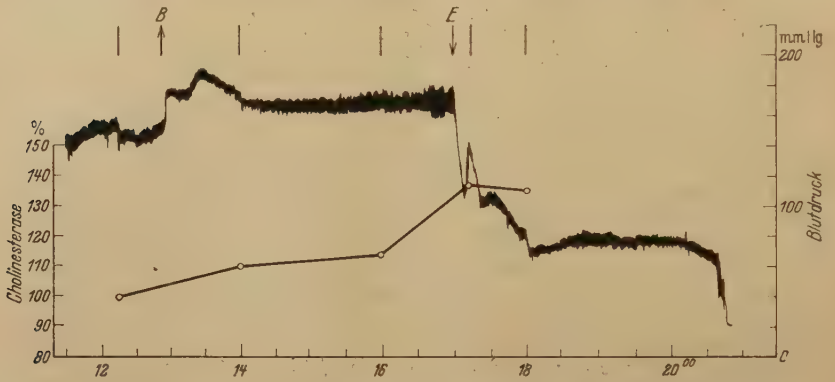


Abb. 1. Blutdruck und Serumcholinesterase während und nach ESMARCHscher Blutleere. Hund Nr. 69, 12. 9. 44. Jagdhündin, 10 kg. *B* Beginn, *E* Ende der Blutleere, die übrigen Marken geben den Zeitpunkt der Blutentnahmen zur Cholinesterasebestimmung an. o——o = Cholinesterase (100% = 7,58%-Einheiten).

und tabellarische Darstellung der Ergebnisse wurde wie in den früheren Mitteilungen der letzte Esterasewert vor der Schädigung gleich 100% gesetzt. In Prozenteinheiten, d. h. also in absoluten Werten, streuten diese Anfangswerte der Versuchstiere zwischen 2—8 Prozenteinheiten. Trotz der verschiedenen Ausgangshöhen der EA wird durch die Übertragung in relative Prozentwerte erreicht, daß die einzelnen Kurven und Tabellen bei Einsetzen der angewandten Alteration das gleiche Zahlenniveau besitzen.

Die Blutleere wurde in verschiedener Weise durchgeführt:

1. Bei 2 Hunden wurden mit ESMARCHschen Binden beide Hinterbeine möglichst hoch am Oberschenkel 4 Stunden abgebunden, dann die Abschnürung rasch geöffnet. Abb. 1 bringt ein Versuchsbeispiel.

2. In 3 weiteren Versuchen wurde die Blutleere mit Hilfe RECKLINGHAUSENscher Manschetten bei einem Druck von 190—210 mm Hg für die Dauer von $2^1/_2$—4 Stunden hergestellt und dann rasch aufgehoben. Ein Versuchsbeispiel in Abb. 2.

3. Bei 3 weiteren Hunden wurden an beiden Hinterbeinen Arteria und Vena femoralis unterhalb des Ligamentum inguinale für 4 bzw. 5 Stunden abgeklemmt. Die Klemmen wurden nach dieser Zeit rasch wieder geöffnet. Versuchsbeispiel in Abb. 3.

[9] TRUETA, J., A. E. BARCLAY, P. M. DANIEL, K. J. FRANKLIN and M. M. L. PRICHARD: Studies of the renal circulation. Oxford 1947.

4. Bei den beiden letzten Tieren wurde nach steriler Eröffnung der Bauchhöhle Aorta abdominalis und Vena cava mittels chirurgischer Darmklemmen, deren Branchen zur Schonung des Gewebes mit weichem Gummischlauch überzogen waren, unterhalb des Abganges der Arteriae renales für 2 bzw. 4 Stunden

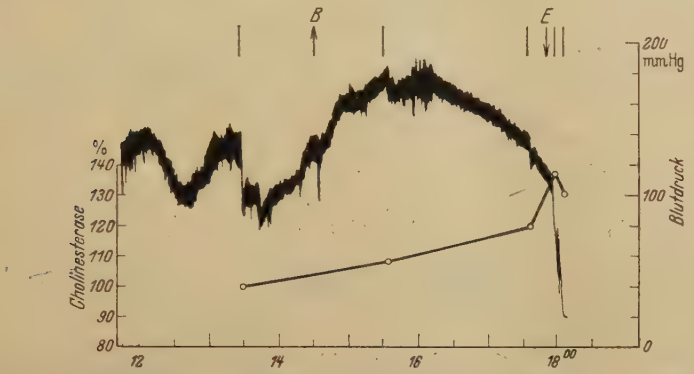


Abb. 2. Blutdruck und Serumcholinesterase während und nach Blutleere mittels Recklinghausenscher Manschetten. Hund Nr. 70, 14. 9. 44. Terrier, 9,5 kg. *B* Beginn, *E* Ende der Blutleere, die übrigen Marken geben den Zeitpunkt der Blutentnahmen zur Cholinesterasebestimmung an. o——o = Cholinesterase (100% = 4,56%-Einheiten).

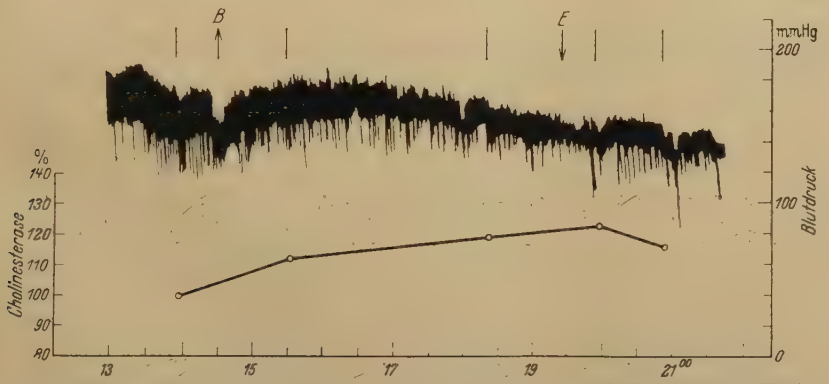


Abb. 3. Blutdruck und Serumcholinesterase während und nach Ischämie der Hinterbeine durch Unterbindung der Arteria und Vena femoralis. Hund Nr. 89, 10. 1. 45. Straßenhund, 16,5 kg. *B* Beginn, *E* Ende der Ischämie, die übrigen Marken geben den Zeitpunkt der Blutentnahmen zur Cholinesterasebestimmung an. o——o = Cholinesterase (100% = 6,49%-Einheiten).

abgeklemmt. Auch hier wurden die Klemmen nach Ablauf dieser Zeit rasch wieder gelöst. Versuchsbeispiel in Abb. 4.

Es wurde bei allen Versuchen darauf geachtet, daß es nicht zu Unterkühlungen der Hunde kam. Andererseits wurde vermieden, die Temperatur lokal oder im ganzen stärker zu erhöhen, um unübersichtliche Komplikationen der Versuche durch Strahlungs- oder Verbrennungsschäden auszuschalten. Weder während der Unterbrechung der Durchblutung noch nach ihrer Wiederherstellung kam es zu bemerkenswerten Schwankungen der Körpertemperatur. Hämolyse des Blutes

wurde bei den Tieren der 1. Gruppe nicht, bei den übrigen nicht regelmäßig und stets nur in geringer Form, oft nur in einzelnen Proben und ohne Zusammenhang mit Blutdruck- oder Esteraseänderungen beobachtet.

Zu schweren, schockartigen Blutdrucksenkungen kam es nach Wiederherstellung der Zirkulation in allen Versuchen der 1. und 2. Gruppe. Hier war auch der Blutdruck in jedem Fall nach Abbinden angestiegen (Abb. 1 und 2). Dieser Anstieg blieb in der Gruppe 1 während der Gesamtdauer der Blutleere bestehen, dagegen konnte der gleiche Befund in der Gruppe 2 nur bei 2 Tieren erhoben werden, in

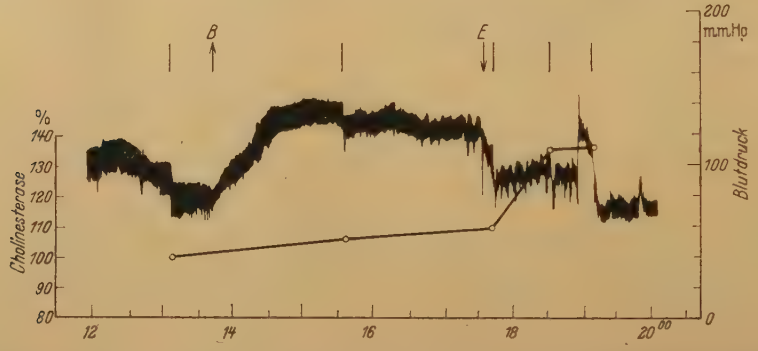


Abb. 4. Blutdruck und Serumcholinesterase während und nach Unterbrechung der Durchblutung an der Aorta abdominalis und der Vena cava. Hund Nr. 94, 22. 1. 45. Jagdhund, 17 kg. *B* Beginn, *E* Ende der Durchblutungsunterbrechung, die übrigen Marken geben den Zeitpunkt der Blutentnahmen zur Cholinesterasebestimmung an. o——o = Cholinesterase (100% = 2,45%-Einheiten).

dem 3. Versuch dieser Gruppe war ein Anstieg nur in den ersten 2 Stunden während der Abschnürung festzustellen. In diesem Versuch war dann auch die Blutdrucksenkung nach Wiederdurchblutung am schwächsten. Möglicherweise war die Blutleere hier nicht genügend vollständig. Bei den Hunden der Gruppe 3 blieb der Blutdruck während der Gesamtversuchsdauer konstant (Abb. 3). In den Versuchen der Gruppe 4 (Abb. 4) kam es zu Steigerungen des Blutdrucks während der Abklemmung, nach Wiederdurchblutung zu Senkungen, welche beide jedoch nicht das Ausmaß der Blutdrucksteigerungen und -senkungen in Gruppe 1 und 2 erreichten. In keinem Fall setzten schockartige, bald tödlich wirkende Blutdrucksenkungen bei den Tieren der Versuchsgruppe 3 und 4 nach Wiederherstellung der Zirkulation ein.

Die Ergebnisse der Cholinesterasebestimmungen der Versuchstiere sind in den Tabellen 1—4 wiedergegeben. Bei den beiden Versuchen der 1. Gruppe mit ESMARCHscher Blutleere (Tabelle 1) kam es während und namentlich nach Lösen der Blutleere zur Steigerung der EA im Serum mit Werten bis zu 135,5 und 137%.

Tabelle 1.

	Vor Beginn der Blutleere	Nach Beginn der Blutleere		Nach Lösen der Blutleere		
Hund 69		Dauer der Blutleere 240 Min.				
	40 Min.	65 Min.	185 Min.	15 Min.	45 Min.	
	100,0%	110,0%	113,0%	135,5%	134,1%	
Hund 77	40 Min.	40 Min.	210 Min.	35 Min.	70 Min.	182 Min.
	100,0%	95,8%	106,8%	126,4%	137,0%	127,0%

Von den Versuchshunden der Gruppe 2, bei denen mittels Recklinghausenscher Manschetten eine Blutleere beider Hinterbeine erzeugt wurde, zeigten 2 Tiere ein ähnliches Verhalten. Die Esteraseanstiege betrugen hier 124,5 und 137,0% (Tabelle 2).

Im 3. Versuch dieser Reihe (Hund 74) kam es zu Beginn der Blutleere zur erheblichen Senkung der EA. Nach Wiederherstellung der Blutzirkulation wurden Werte gefunden, die um den Ausgangswert schwankten. Bemerkenswert war, daß bei diesem Tier zur Zeit der Entnahme der Blutprobe 2, in welcher der von den anderen Versuchen abweichende niedrige Wert festgestellt wurde, die Narkose unzureichend und der Hund unruhig war. Er erhielt ausnahmsweise unmittelbar nach Entnahme dieser Blutprobe Chloralose intravenös, blieb aber während der Dauer der Blutleere unruhig. Daß bei Reizung sensibler Nerven an nicht narkotisierten Tieren Senkungen der EA im Blutserum beobachtet werden können, hatten bereits Frommel und Mitarbeiter[10] am Meerschweinchen festgestellt. Da infolge der ungenügenden Narkose in diesem Versuch die Schmerzempfindung nicht voll ausgeschaltet war, wie die Reaktion des Tieres zeigte, ist möglicherweise die gefundene Senkung auf den Erfolg der sensiblen Reizung durch die Abschnürung zurückzuführen.

Tabelle 2. (Versuchsgruppe 2.)

	Vor Beginn der Blutleere	Nach Beginn der Blutleere		Nach Lösen der Blutleere		
Hund 70		Dauer der Blutleere 220 Min.				
	70 Min.	65 Min.	185 Min.	5 Min.		20 Min.
	100,0%	107,0%	119,8%	137,0%		130,5%
Hund 74		Dauer der Blutleere 150 Min.				
	70 Min.	60 Min.		20 Min.	80 Min.	140 Min.
	100,0%	63,0%		98,5%	93,0%	114,5%
Hund 95		Dauer der Blutleere 240 Min.				
	30 Min.	120 Min.		5 Min.	60 Min.	120 Min.
	100,0%	115,8%		124,5%	123,0%	124,5%

Bei Unterbrechung der Durchblutung an den Femoralarterien und -venen (Gruppe 3) kam es ebenfalls zu Anstiegen der EA während der Durchblutungsunterbrechung, diese Steigerungen nahmen auch hier nach

[10] Frommel, E., M. Thalheimer, A. D. Herschberg u. I. Piquet: Helvet. physiol. Acta 1, 451 (1943).

Tabelle 3. (Versuchsgruppe 3.)

	Vor Beginn der Blutleere	Nach Beginn der Blutleere		Nach Lösen der Blutleere	
Hund 71		Dauer der Blutleere 240 Min.			
	60 Min.	60 Min.	180 Min.	30 Min.	90 Min.
	100,0%	110,0%	120,5%	121,5%	124,0%
Hund 82		Dauer der Blutleere 240 Min.			
	40 Min.	60 Min.	180 Min.	30 Min.	90 Min.
	100,0%	100,8%	105,0%	113,0%	109,6%
Hund 89		Dauer der Blutleere 300 Min.			
	40 Min.	60 Min.	235 Min.	30 Min.	90 Min.
	100,0%	112,0%	118,8%	123,0%	116,5%

Wiederherstellung der Durchblutung noch weiter zu (Tabelle 3). Die EA-Werte erreichten 113, 123, bzw. 124% nach Lösung der Blutleere.

Nach reiner Ischämie (Abklemmung der Aorta und Vena cava, Gruppe 4) mit länger dauernder Durchblutungsunterbrechung kam es während der Blutleere (Hund 94) zu einem geringen Anstieg der EA im Serum, nach Wiederdurchblutung wurde ein weiterer Anstieg der EA (bis 136%) beobachtet. Bei kürzerer Dauer (2 Stunden) der Blutleere kam es wohl während und kurz nach Lösung derselben zu einer Steigerung (Hund 91) bis auf 114%, jedoch trat im weiteren Verlauf des Versuchs ein Abfall auf den Ausgangswert ein (Tabelle 4). Die erreichten Höchstwerte nach Lösung der Blutleere mit 114 bzw. 136% liegen einwandfrei außerhalb der dreifachen mittleren Fehlerbreite der Leerversuche (s. oben).

Tabelle 4. (Versuchsgruppe 4.)

	Vor Beginn der Blutleere	Nach Beginn der Blutleere	Nach Lösen der Blutleere		
Hund 94		Dauer der Blutleere 240 Min.			
	30 Min.	120 Min.	5 Min.	60 Min.	95 Min.
	100,0%	106,0%	109,5%	135,0%	136,0%
Hund 91		Dauer der Blutleere 120 Min.			
	30 Min.	60 Min.	5 Min.	65 Min.	
	100,0%	108,0%	114,0%	94,2%	

Besprechung der Ergebnisse.

Der Schock nach ESMARCHscher Blutleere muß entsprechend den Untersuchungen von SCHWIEGK und SCHÖTTLER[7] als Volumenmangelkollaps angesehen werden. Aus den durch langdauernde Drosselung der Durchblutung geschädigten Kapillaren des Gewebes tritt Blutplasma aus, wobei es zur Volumenzunahme der Gliedmaßen und zum Gewebsödem kommt. Das Ödem konnte auch in den eigenen Versuchen in mehr oder weniger starkem Ausmaß beobachtet werden

Als Zeichen derartigen Plasmaverlustes finden sich Verminderung der zirkulierenden Blutmenge, sowie Zunahme des Hämoglobins und der Erythrozyten des Blutes, Absinken des Herzminutenvolumens und des Blutdrucks (Schwiegk, s. oben). Als Gegenregulation gegen die Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens soll es nach Duesberg und Schroeder[11] bei dem Volumenmangelkollaps zur sympathikotonen Kreislaufumstellung mit Spannungszunahme zentraler Gefäße kommen. Trueta und Mitarbeiter (s. oben) konnten in Abschnürungsversuchen an narkotisierten Ratten neben einer ödematösen Anschwellung der Versuchsextremität röntgenologisch feststellen, daß es während der Abschnürung zu einem starken Spasmus der Femoralarterie kommt, der noch lange Zeit nach Lösung der Blutleere anhält. Dieser Spasmus erstreckt sich weit zentralwärts (!) über die Abschnürungsstelle hinweg und greift gewöhnlich auf die Bauchaorta und die Nierenarterien über. Auch an der entsprechenden nicht geschädigten Extremität ist ein Spasmus der Arterien in ähnlicher Ausdehnung und Stärke festzustellen. Nach experimenteller Degeneration der Nn. splanchnici trat bei sonst gleicher Versuchsanordnung derselbe Befund an Femoralarterien und Aorta ein, während die Nierenarterien hier keine Kontraktion zeigten. Da in den eigenen Versuchen bei Abklemmung der Bauchaorta und Vena cava (Versuchsanordnung 4) eine derartige Kontraktion der Gefäße nicht beobachtet wurde, dürfte diese Tatsache den unterschiedlichen Ausfall der Blutdruckregulation nach den verschiedenen Schädigungen erklären, sofern man unterstellt, daß auch an Hunden die Abschnürung der Extremität wie bei Ratten zum Gefäßspasmus führt.

Wie oben gesagt, zeigten in den eigenen Versuchen nur die Tiere der Gruppe 1 und 2 nach Lösung der Esmarchschen Blutleere mittels Abschnürung durch Gummibinden bzw. Gummimanschetten kollapsartige Blutdrucksenkungen, während diese in den Versuchsgruppen 3 und 4 mit reiner Gefäßabklemmung fehlten. Es muß demnach bei den Abschnürungsversuchen neben der Aufhebung der Blutzirkulation die mechanische Schädigung von Haut und Muskulatur (Druckschädigung an den Abschnürungsstellen), vor allem aber wohl mechanisch bedingte Alterationen der Nerven zusätzlich eine Rolle spielen. Für eine derartige Deutung spricht auch die Beobachtung, daß es bei allen Fällen der Versuchsgruppe 1 und 2 nach Wiederdurchblutung zur starken Zyanose der geschädigten Extremitäten bis zur blauschwarzen Färbung mit kapillärer Stase und Blutaustritten in die Haut als makroskopisch sichtbare Zeichen erheblicher Durchblutungsstörungen der terminalen Strombahn kam. In den Versuchen der beiden anderen Gruppen wurde dies nur in wesentlich geringerem Ausmaß beobachtet.

Unter der in den eigenen Versuchen in mehr oder weniger starkem Ausmaß sicher einsetzenden sympathischen Erregung erfolgt als kompensatorische Maßnahme des Organismus Entleerung der Blutspeicher und Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren. In gleicher Weise könnten die Steigerungen der EA gedeutet werden. Durch Erhöhung der EA erfolgt schnellere Zerstörung des an den Nervenendigungen gebildeten Azetylcholins und damit eine Unterstützung aller

[11] Duesberg, R. u. W. Schroeder: Pathophysiologie und Klinik der Kollapszustände. Leipzig 1944.

anderen reaktiven Kreislaufänderungen. Wenn auch die Steigerung der EA *während* der Blutleere wohl nicht auf Ausschüttung von Gewebsesterase aus dem geschädigten Gewebe in das Blut zurückgeführt werden können, so darf doch nicht übersehen werden, daß eine weitere Erhöhung der EA *nach Lösung* der jeweiligen Blutleere auf derartige Einschwemmung von Gewebscholinesterase in das Blut beruhen könnten.

Eine Entscheidung hierüber kann einmal durch eine Typenanalyse der Cholinesterase in entsprechenden Versuchen gefällt werden, zum anderen aber auch, wenn sich an anderen Versuchstieren bei gleicher oder ähnlicher Schädigung infolge entgegengesetzt ablaufender vegetativer Reaktion eine Senkung der EA finden würde.

B. Traumatischer Schock.

Im *primären* traumatischen Schock, welcher unmittelbar im Anschluß an ein Trauma auftreten kann, sind nach DUESBERG und SCHROEDER[11] alle Zeichen einer Vaguserregung mit Entspannung der Blutgefäße zu beobachten. Im Gegensatz dazu kommt es im Verlauf des *sekundären* Wundschocks, der sich langsam im Laufe von Stunden nach erfolgter Verletzung entwickelt und in seinem Kreislaufverhalteu weitgehend dem Volumenmangelkollaps ähnelt, zur Zentralisation des Blutes in lebenswichtigen Organen unter Einfluß des Sympathikus.

In Versuchen mit und ohne Narkose an Meerschweinchen hatten bereits FROMMEL und Mitarbeiter (s. oben) im traumatischen Schock und nach Reizung sensibler Nerven Senkungen der EA im Blutserum beobachtet. Derartige sensible Reizungen werden für die Entstehung des primären traumatischen Schocks und der mit diesem verbundenen Vaguserregung verantwortlich gemacht (vgl. TOMB [2]).

Entsprechend der eigenen Arbeitshypothese, nämlich einer bestehenden, bestimmten Relation der Höhe der Cholinesterasewerte im Blutserum und der vegetativen Regulationslage des Organismus, mußten in derartigen Versuchen an Hunden mit experimentellem, primären traumatischen Schock entsprechend der vorhandenen Vaguserregung Senkungen der EA erwartet werden.

Tierversuche.

An 4 Hunden wurde ein Trauma durch Zertrümmerung der Oberschenkelmuskulatur unter möglichster Schonung der Haut und Vermeidung von Knochen- und gröberen Gefäßverletzungen in tiefer Narkose gesetzt. Ein Versuchsbeispiel bringt Abb. 5.

Obwohl die Art der Verletzung an den Versuchstieren möglichst gleichartig durchgeführt wurde, war die Reaktion des Blutdrucks während und nach dem Trauma verschieden. In dem angeführten

[12] TOMB, J. W.: Lancet **1937**, 1416.

Versuchsbeispiel (Hund 45, Abb. 5) setzte eine deutliche Blutdrucksenkung während der Durchführung der Verletzung ein, im weiteren Verlauf des Versuches erfolgte dann ein starker Abfall des Blutdrucks (insgesamt 130 mm Hg, von 190 auf 60 mm). Im Versuch 48 (vgl. Cholinesterasewerte in Abb. 6 und Tabelle 5) betrug der Blutdruckabfall während der Durchführung der Verletzung 40 mm Hg (von 160 auf 120 mm). Unmittelbar nach Setzen des Traumas stieg der Blutdruck wieder auf etwa 150 mm und erreichte 2 Stunden später den Wert vor der Verletzung. Bei dem Versuchstier 50 sank der Karotisdruck während des Traumas von 188 auf 158 mm. Im weiteren Verlauf des Experimentes kam es zwar nicht zum raschen Abfall des Blutdrucks, aber eben so wenig zu einer Erholung. Für die Dauer von etwa $1^3/_4$ Stunden schwankte der Druck wenig um 160 mm, um dann langsam abzusinken. Im Versuch 51 beeinflußte das Trauma die Blutdruckhöhe von durchschnittlich 170 mm Hg überhaupt nicht. Im weiteren Verlauf des Versuchs ergaben sich dann allerdings nach jeder Blutentnahme zur Esteraseauswertung Senkungen von jeweils 20—30 mm, die jedoch jedesmal, wenn auch langsam, fast bis zur Ausgangshöhe ausgeglichen wurden.

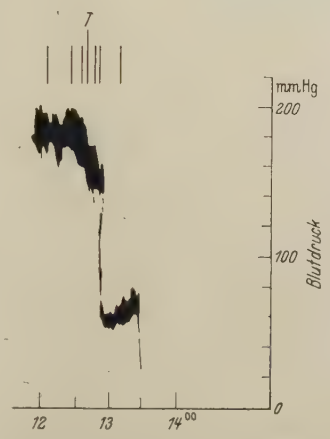


Abb. 5. Blutdruck im traumatischen Schock. Hund Nr. 45, 8. 2. 44. Straßenhund, 10,5 kg. *T* Trauma, die übrigen Marken geben den Zeitpunkt von Blutentnahme zur Bestimmung der Cholinesteraseaktivität an.

Ein tödlicher Schock wurde nicht gesehen. Auch interessierte in diesem Zusammenhang das weitere Schicksal der Versuchstiere weniger, so daß ich vorzog, die Tiere bald nach Abschluß des eigentlichen Versuchs bei noch laufender Narkose zu töten.

Die in den Versuchen gefundenen Cholinesterasewerte sind aus der Abb. 6 und der Tabelle 5 zu ersehen.

Abgesehen von einem Tier (48) erfolgte nach Einwirkung des Traumas ein rasches Absinken der Aktivität der Cholinesterase im

Tabelle 5. (Vollblut.)

		Vor dem Trauma			Nach dem Trauma		
Hund 45	Zeit	35 Min.	15 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.
	EA	97,5%	95,0%	100,0%	100,0%	95,0%	91,5%
Hund 48	Zeit	70 Min.	12 Min.		110 Min.		
	EA	104,5%	100,0%		101,5%		
Hund 50	Zeit	45 Min.			30 Min.	60 Min.	125 Min.
	EA	100,0%			92,0%	92,0%	85,0%

Blutserum (Abb. 6). Wie die Tabelle 5 zeigt, wurden bei Vollblut-Auswertungen in dieser Versuchsreihe entsprechende Ergebnisse erzielt. Allerdings erreichte der Abfall im Serum mit höchstens 18% (Hund 50) nicht derartige Werte, wie sie FROMMEL und Mitarbeiter in ihren Versuchen an Meerschweinchen beobachten konnten. Ich führe diesen Unterschied in der Hauptsache darauf zurück, daß in den eigenen Untersuchungen im Gegensatz zu FROMMEL an narkotisierten Tieren gearbeitet wurde. Auch FROMMEL hatte in seinen Versuchen nach Anwendung von Narkose wesentlich schwächere Ausschläge gesehen als an nicht narkotisierten Tieren.

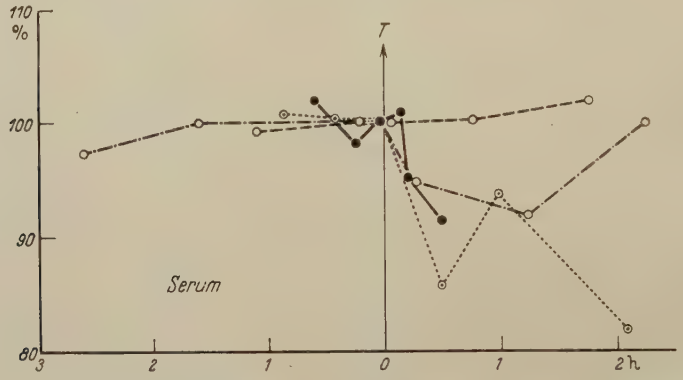


Abb. 6. Cholinesterase des Blutserums im traumatischen Schock. *T* Zeitpunkt des Traumas. ●——● Hund Nr. 45; o——o Hund Nr. 48; ○·····○ Hund Nr. 50; o—·—·—o Hund Nr. 51.

Nur in einem Versuch (Hund 50) gehen die Esterasewerte nach dem Trauma mit 85 bzw. 82% über die dreifache mittlere Fehlerbreite der Vorversuche wesentlich hinaus. Betrachtet man jedoch in den übrigen Versuchen die Leerwerte vor Einsetzen der Schädigung, so liegen die tiefsten Werte bei den Versuchshunden 45 und 51 deutlich außerhalb des dreifachen Wertes der in der jeweiligen Vorperiode beobachteten schwachen Abweichungen vom Ausgangswert.

Besprechung der Ergebnisse.

Es kam nicht darauf an, in den eigenen Versuchen einen möglichst starken Ausschlag der Esteraseänderung zu erreichen, sondern es interessierte vielmehr die *Richtung* des Ausschlags. In den früheren eigenen Untersuchungen über Esteraseänderungen im Blutserum (s. oben) lagen Kreislaufänderungen im Sinne einer sympathikotonen Umstellung vor, während hier dagegen eine vagotone Reaktionslage erwartet werden mußte. Diese Versuche hatten daher entscheidenden Einfluß für die Deutung der Aktivitätsänderungen überhaupt. Da

sich hier entsprechend den Erwartungen *Absinken* der EA zeigte, kann nun mit Sicherheit gesagt werden, daß die beobachteten Änderungen der Aktivität der Cholinesterase des Blutserums in den verschiedenen Versuchsreihen in einer Beziehung zu Änderungen in der Reaktionslage des vegetativen Nervensystems stehen und zwar derart, daß bei überwiegendem Sympathikotonus Aktivitätssteigerungen, bei vorherrschendem Vagotonus Aktivitätsminderung zur Beobachtung kommt. Die bereits früher geäußerte Annahme einer kreislaufregulatorischen Funktion der Cholinesterase erhält damit eine weitere Stütze.

Die mitgeteilten Versuche bringen allerdings noch keine Lösung der Frage, ob die Aktivitätsänderungen sekundäre Folgen der vegetativen Umstellungen darstellen, etwa im Sinne eines erhöhten bzw. verminderten Verbrauchs oder einer verringerten bzw. verstärkten Neubildung oder ob sie andererseits bei der Auslösung vegetativer Funktionsänderungen primär eine Rolle spielen.

Zusammenfassung.

1. In Versuchen an Hunden wurde nach mehrstündiger Esmarchscher Blutleere von Gliedmaßen Steigerungen der Cholinesterasewerte des Blutserums beobachtet. Ähnliche Steigerungen fanden sich nach einer Blutleere, welche mit Hilfe von bis zu einem Druck von 190 bis 210 mm Hg aufgeblasenen Recklinghausenschen Gummimanschetten hergestellt wurde, weiterhin fanden sich Steigerungen der Esteraseaktivität nach Unterbrechung der Gliedmaßendurchblutung an der Arteria und Vena femoralis oder an der Aorta abdominalis und Vena cava.

2. Im primären traumatischen Schock an narkotisierten Hunden zeigte sich eine Senkung der Cholinesterasewerte im Blut und Blutserum.

3. Nach Untersuchungen von anderer Seite muß beim Blutleereschock als Volumenmangelkollaps eine sympathikotone Regulationslage des Organismus erwartet werden, während der primäre traumatische Schock vorherrschenden Vagotonus aufweist. Unter Berücksichtigung früherer eigener Untersuchungen wird geschlossen, daß die Änderungen der Cholinesteraseaktivität parallel gehen mit Änderungen der vegetativen Regulationslage, indem bei Steigerung des Sympathikotonus Erhöhungen und bei vorherrschender Vaguserregung Senkungen der Esteraseaktivität auftreten.

Frau Dorothea Jonckheer-Schultz danke ich für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Cholinesterasebestimmungen. Das für die Untersuchungen verwandte Azetylcholin stellte ebenso wie für die früheren Untersuchungen die Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

Untersuchungen über die Adrenalinbildung durch Nebennierengewebe.

Von

Peter Holtz und Günther Kroneberg.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1948.)

Durch wiederholte Applikation geeigneter physikalischer oder chemischer Reize ist es möglich, die Nebennieren in kurzer Zeit zur Abgabe von Adrenalinmengen zu veranlassen, welche die ursprünglich in der Drüse vorhandenen um das Mehrfache übersteigen. Das Organ besitzt die Fähigkeit, die entleerten Depots sehr schnell durch Neubildung des Hormons wieder aufzufüllen. Es ist anzunehmen, daß der Weg, auf dem in solchen Fällen die regenerative Synthese von Adrenalin erfolgt, ein *kurzer* ist — daß konstitutionell dem fertigen Hormon nahe verwandte Vorstufen zur Verfügung stehen. Hierfür spricht auch die bekannte Tatsache, daß die mit *pharmakologischer* Methodik vorgenommene Adrenalinbestimmung in der Nebenniere immer geringere Werte ergibt als die *kolorimetrische* Bestimmung, da diese auch die biologisch unwirksamen oder weniger wirksamen, nur *chemisch* nahestehenden Vorstufen miterfaßt.

Schon in der älteren Literatur[1] finden sich Angaben über Versuche, bestimmte aromatische, dem Adrenalin ähnlich aufgebaute *Aminosäuren* durch die Nebennieren in Adrenalin überführen zu lassen. Solche z. B. mit *Dioxyphenylalanin, Tyrosin* oder *Phenylalanin* ausgeführten Versuche mußten ein negatives Ergebnis haben; denn für eine Überführung von Aminosäuren in das sekundäre Amin-Adrenalin wäre eine *Decarboxylierung* zu den Aminen Voraussetzung. Aus eigenen Untersuchungen wissen wir aber, daß die *Nebennieren* keine aminosäuredecarboxylierenden Fermente besitzen. Diese finden sich vielmehr vor allem in der *Niere*, bei manchen Tierarten auch in der *Leber*, im *Pankreas* und im *Darm*[2]. In diesen Organen aus Aminosäuren gebildete Amine könnten der Nebenniere dann als Muttersubstanz für die Adrenalinsynthese dienen.

Vor mehr als 20 Jahren berichtete Nikolajeff[3] über die Entstehung einer adrenalinähnlichen Substanz aus *Tyramin*, wenn *Rinder*nebennieren mit

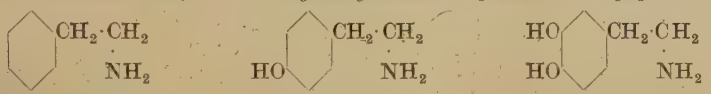
[1] Ewins, A. J. u. P. P. Laidlaw: J. Physiol. (Brit.) **40**, 275 (1910). — Funk, C.: J. Physiol. (Brit.) **43**, Proc. S. 4 (1911/12). — [2] Holtz, P., K. Credner u. W. Koepp: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942). Übersicht bei P. Holtz: Erg. Physiol. **44**, 230 (1941). — Siehe auch E. Werle, Fermentforsch. **17**, 103 (1943). — [3] Nikolajeff, M. P.: Z. exper. Med. **42**, 213 (1924).

tyraminhaltiger Ringerlösung durchströmt wurden. Schuler und Wiedemann[4] ließen *Meerschweinchen*-Nebennierengewebe auf *Tyramin*, *Phenyläthylamin* und andere Amine einwirken und glaubten, vor allem gestützt auf die Ergebnisse kolorimetrischer Bestimmungen, in einigen Versuchen eine Adrenalinbildung aus Tyramin nachgewiesen zu haben, während das mit Phenyläthylamin nicht möglich war. Wir sind schon einmal in einer früheren Arbeit[5] auf die Untersuchungen von Schuler eingegangen und haben die Gründe dargelegt, aus denen wir ihre Ergebnisse nicht für überzeugend halten. Einige Jahre später fand Devine[6] ebenfalls mit Hilfe kolorimetrischer Methoden, daß gerade *Phenyläthylamin*, das sich in den Schulerschen Versuchen als ungeeignet erwiesen hatte, besonders leicht durch Nebennierengewebe in Adrenalin umgewandelt werde.

Die *eine* unserer Arbeit zugrunde liegende Fragestellung lautet: Welche „Vorstufen", d. h. welche dem Adrenalin chemisch verwandten Derivate können von der Nebenniere in Adrenalin umgewandelt werden, bzw. wieweit darf eine chemische Verbindung sich konstitutionell vom Adrenalin entfernen, ohne die Fähigkeit zu verlieren, dem Nebennierengewebe noch als Muttersubstanz für die Hormonbildung zu dienen? Die *zweite* Frage, auf die eine Antwort zu geben versucht werden soll, ist die nach dem *physiologischen* Weg, dem „Hauptweg" der Adrenalinsynthese im Organismus und nach der *Reihenfolge* der Stufen, die er durchläuft.

Versuche.

I. Adrenalinvorstufen: Phenyläthylamin, Tyramin, Oxytyramin.



Phenyläthylamin Tyramin Oxytyramin

Wir haben Versuche mit *Oxytyramin*, *Tyramin* und *Phenyläthylamin* gemacht, indem wir Nebennierengewebe auf wäßrige Lösungen der 3 Amine bei Körpertemperatur einwirken ließen und anschließend untersuchten, ob die ihnen an sich schon zukommende, aber weit schwächer als beim Adrenalin ausgeprägte *blutdrucksteigernde* Wirkung eine Zunahme erfuhr. In diesem Falle wäre dann zwar auch nicht der strikte Beweis für die Umwandlung des betreffenden Amins in *Adrenalin selbst* erbracht, es durfte aber angenommen werden, daß aus dem Amin zumindest eine auf dem Wege zum Adrenalin liegende und diesem pharmakologisch näherstehende Substanz entstanden war.

Methodik.

Aus frischer Nebenniere von *Rind*, *Schwein* und *Meerschweinchen* hergestellte Rasiermesserschnitte wurden in etwa 15 cm³ fassende Atmungströge der

[4] Schuler, W. u. A. Wiedemann: Hoppe-Seylers Z. **233**, 235 (1935). — [5] Holtz, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 684 (1937). — [6] Devine, J.: Biochem. J. (Brit.) **34**, 21 (1940).

BARCROFT-WARBURG-Apparatur gebracht und in 4 cm³ m/20 Phosphatpuffer von p_H 6,8 suspendiert. In die *Kontrollgläser* wurde zusätzlich 1 cm³ Puffer, in die *Versuchsgläser* 1 cm³ Aminlösung gegeben, die 0,5—2 mg des betreffenden Amins enthielt. Nach Anschluß der Gefäße an die Manometer der Apparatur ließen wir in *Luftatmosphäre* bei 38° 1—3 Stunden schütteln. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug ungefähr 60 Exkursionen je Minute. Die nach einer bestimmten Zeit von den Gewebeschnitten abgegossene Lösung wurde im *Blutdruck*versuch an der mit Pernocton narkotisierten Katze untersucht. Miteinander verglichen wurden 1. die *aminfreie* Kontrollösung, die nur das aus den geschüttelten Nebennierenschnitten hinausdiffundierte Adrenalin enthielt, 2. die gleiche Kontrollösung, die *nachträglich* in der Injektionsspritze mit der entsprechenden Aminmenge vermischt wurde, 3. die *aminhaltige* Versuchslösung, auf die das Nebennierengewebe *eingewirkt* hatte.

Die Versuche und die Deutung ihrer Ergebnisse werden erschwert dadurch, daß die Substanz, deren *Neubildung* nachgewiesen werden soll, schon *von vornherein* in großer Menge im Nebennierengewebe vorhanden ist und von diesem an die Suspensionsflüssigkeit abgegeben wird — in einer Menge, welche die zu erwartende Neubildung aus dem angebotenen Substrat unter Umständen übertrifft. Das gilt besonders für die adrenalinreiche *Rinder*nebenniere. Die eindeutigsten Ergebnisse wären zu erwarten, wenn es gelänge, die Ausgangs- und Kontrollwerte zu „Nullwerten" herabzudrücken. Um wenigstens einen Teil des präformierten Adrenalins zu beseitigen, wurden die Rindernebennierenschnitte, meistens auch diejenigen aus Schweinenebenniere, 30—45 Min. lang in Pufferlösung ohne Substrat *vorgeschüttelt* unter viertelstündlicher Auswechselung der Suspensionsflüssigkeit. Das vorgeschüttelte Gewebe wurde dann in frischen Phosphatpuffer gebracht und erst dann mit Substrat versetzt.

Die Gewebeschnitte wurden auf der Torsionswaage abgewogen: 150—500 mg je Versuchsglas. Um eine möglichst gleichmäßige und gleichwertige Verteilung auf die einzelnen Ansätze zu gewährleisten, wurden die großflächigen Einzelschnitte aus Rinder- und Schweinenebenniere mit der Schere in 2—3 Teile zerschnitten und auf die später miteinander zu vergleichenden Kontroll- und Versuchsansätze verteilt. In allen Versuchen wurden sowohl der Kontrollansatz als jeder einzelne Versuchsansatz, der das betreffende Amin enthielt, immer mindestens als *Doppelbestimmung*, sehr häufig *dreifach* angesetzt, um den Unsicherheitsfaktor, der durch die Schwierigkeit gleichmäßiger Verteilung des adrenalinhaltigen Gewebes auf die einzelnen Gläser entsteht, nach Möglichkeit auszuschalten.

Oxytyramin. Für die ersten Versuche mit *Oxytyramin* konnten wir ein uns seinerzeit von *Merck-Darmstadt* zur Verfügung gestelltes Präparat benutzen, von dem wir noch einige Milligramm besaßen. Später stellten wir selbst das Amin her, indem wir dopadecarboxylasehaltigen Meerschweinchen- oder Schweinenierenextrakt auf l-Dioxyphenylalanin (Dopa) 30—60 Min. lang unter anaeroben Bedingungen bei Körpertemperatur einwirken ließen (s. HOLTZ u. Mitarbeiter [2]). Den durch Aufkochen bei p_H 5 enteiweißten und anschließend wieder neutralisierten Extrakt boten wir dann als „Oxytyramin" der Nebenniere an. Dieser zweistufige Arbeitsgang im *Reagensglas* dürfte den Weg kennzeichnen, auf dem auch im *Organismus* die biologische Adrenalinsynthese erfolgt (s. weiter unten Abschnitt 2). *Oxytyramin* ist, wie

wir aus früheren [7] Untersuchungen wissen, an der Katze 20—30mal weniger blutdruckwirksam als Adrenalin. Es war deshalb zu erwarten, daß der Übergang Oxytyramin ⟶ Adrenalin sich in einer wahrnehmbaren Zunahme der pressorischen Wirksamkeit manifestieren würde.

Die Abb. 1 stellt einen Versuch dar, in dem 500 mg *Schweine*nebenniere auf 0,5 mg *Oxytyramin* in 5 cm³ Pufferlösung $1^1/_2$ Stunden eingewirkt hatten. Trotz der „Vorschüttelung" der Gewebeschnitte (s. Methodik) geben sie während der eigentlichen Versuchszeit noch beträchtliche Mengen Adrenalin ab, wie man aus der starken Blutdrucksteigerung ersieht, welche die Injektion von nur 0,2 cm³ des Kontrollansatzes verursacht (NN). Die Injektion der Kontrollösung mit nachträglich zugefügtem Oxytyramin (+ OxyTy) in entsprechender Menge (20 γ Oxytyramin) als „Mischspritze" hatte keine wahrnehmbar stärkere Wirkung als die oxytyraminfreie Lösung. Demgegenüber wirkt der eigentliche Versuchsansatz, in dem das überlebende Nebennierengewebe Gelegenheit hatte, auf Oxytyramin einzuwirken, deutlich stärker (NN/OxyTy). — Ein gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzter Versuch mit *Tyramin*, in dem der Nebenniere 1,0 mg Tyramin angeboten wurde, hatte ein negatives Resultat: „NN/Ty" ist nicht wirksamer als „NN + Ty" (Abb. 1). — Der untere Teil der Abb. 1 (B) bestätigt das positive Resultat mit Oxytyramin

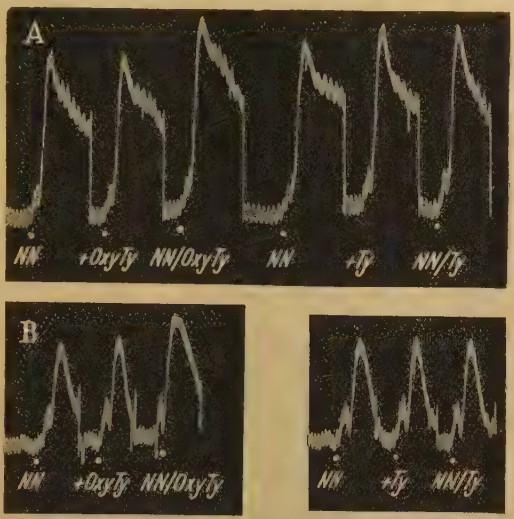


Abb. 1 Au. B. „Adrenalinbildung" aus Oxytyramin durch Schweinenebenniere. Negatives Ergebnis mit Tyramin. Warburgapparatur. Jedes Versuchsgefäß enthält 500 mg Nebennierenschnitte in 5 cm³ Phosphatpuffer, die Ansätze „NN/OxyTy" und „NN/Ty" außerdem 0,5 mg Oxytyramin bzw. 1 mg Tyramin. Schüttelung in Luftatmosphäre $1^1/_2$ Stunden. Anschließend in A: Injektion von je 0,2 cm³ der Suspensionsflüssigkeit in B: 0,2 cm³ der $2^1/_2$fach verdünnten Suspensionslösung im Blutdruckversuch an der Katze. Pernoctonnarkose. NN: Kontrollansatz, der nur Nebennierenschnitte enthielt.
+ OxyTy / + Ty } Kontrollansatz, dem nachträglich die entsprechende Aminmenge zugefügt wurde.
NN/OxyTy / Ty } Versuchsansatz, in dem das Nebennierengewebe auf die Amine eingewirkt hat.
Ergebnis: Die Versuchsansätze mit Oxytyramin („NN/OxyTy") sind wirksamer als die Kontrollen („NN" und „+OxyTy"), die Tyraminansätze („NN/Ty") nicht.

[7] Holtz, P., K. Credner u. W. Koepp: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942).

und das negative mit Tyramin. Es handelt sich um Parallelansätze zu Abb. 1 A, „Doppelbestimmungen", die allerdings für

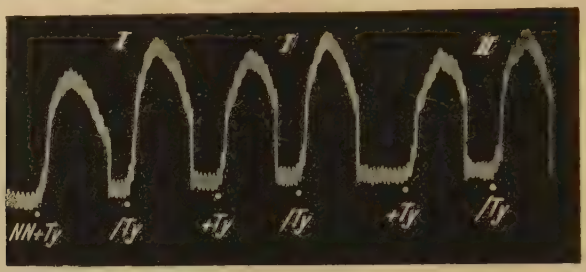


Abb. 2. „Adrenalinbildung" aus Tyramin durch Schweinenebenniere. Versuchsanordnung wie in Abb. 1. 300 mg Schweinenebenniere in 5 cm³ Phosphatpuffer. Zusatz von 0,5 mg Tyramin. Schüttelung: 2½ Stunden. Parallelansätze („Doppelbestimmungen") I und II. Blutdruckversuch an der Katze: „NN + Ty": 0,30 cm³ des Kontrollansatzes, zu dem nachträglich die entsprechende Tyraminmenge gegeben wurde („Mischspritze"). „/Ty": 0,30 cm³ des Versuchsansatzes, in dem das Gewebe auf das Amin eingewirkt hatte. Ergebnis: Bei längerer Einwirkung (2½ Stunden) kann auch Tyramin durch Nebennierengewebe in eine pressorisch wirksamere Substanz umgewandelt werden.

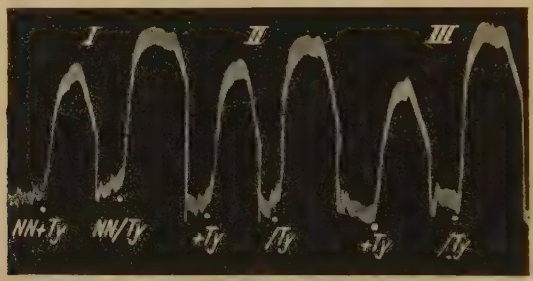


Abb. 3. „Adrenalinbildung" aus Tyramin durch Rindernebenniere. 400 mg Gewebsschnitte in 5 cm³ Puffer. „Vorschüttelung" 45 Min. (s. „Methodik"). Zusatz von 1 mg Tyramin. Drei Parallelansätze: I, II, III. Versuchsdauer: 2 Stunden. Katzenblutdruck: „NN + Ty": 0,2 cm³ Kontrollansatz mit nachträglich zugefügtem Tyramin. „NN/Ty": 0,2 cm³ Versuchsansatz (Einwirkung des Nebennierengewebes auf Tyramin).

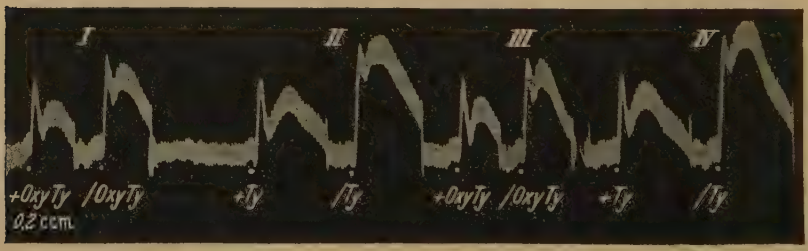
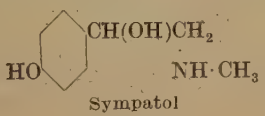


Abb. 4. „Adrenalinbildung" aus Oxytyramin und Tyramin durch Meerschweinchennebenniere. 140 mg Nebennierenschnitte in 3 cm³ Phosphatpuffer. Zusatz von 0,5 mg Amin. Versuchsdauer 2¼ Stunden. Je 2 Parallelansätze (I und III, II und IV.) Katzenblutdruck. Ergebnis: Die pressorische Wirksamkeit der tyraminhaltigen Ansätze hat stärker zugenommen als diejenige der oxytyraminhaltigen (s. Text).

die intravenöse Injektion im Blutdruckversuch auf das 2½fache mit m/20 Phosphatpuffer p_H 6,8 verdünnt worden waren.

Tyramin. Der Weg *Tyramin → Adrenalin* ist länger als der Weg *Oxytyramin → Adrenalin*; ihn zurückzulegen kostet deshalb mehr Zeit. Läßt man *Schweine*nebennierenschnitten mehr Zeit als im ersten Versuch, auf Tyramin einzuwirken — nicht $1^1/_2$, sondern $2^1/_2$ Stunden —, so geht offensichtlich auch Tyramin in Adrenalin oder doch wenigstens in eine stärker blutdruckwirksame, adrenalinähnlichere Substanz über (Abb. 2). Bei einer Versuchsdauer von 2 Stunden läßt sich diese Umwandlung auch mit *Rinder-* und *Meerschweinchen*nebenniere zeigen (Abb. 3 und 4). In dem Versuch mit Meerschweinchennebenniere sind die Ausschläge besonders deutlich (Abb. 4). Die *tyramin*haltigen Versuchsansätze haben stärker an pressorischer Wirksamkeit zugenommen als die *oxytyramin*haltigen des gleichen Versuchs. Die Ursache hierfür liegt vielleicht darin, daß nicht nur der *chemische*, sondern auch der *pharmakologische* „Sprung" vom Tyramin zum Adrenalin größer ist als derjenige vom Oxytyramin zum Adrenalin. Es muß hier aber darauf hingewiesen werden, daß wir auch bei längerer Einwirkungszeit von $2^1/_2$ und 3 Stunden mit *Tyramin* wiederholt Versager beobachtet haben, während die Versuche mit *Oxytyramin* auch bei kürzerer Versuchsdauer immer positiv ausfielen. — Versuche mit *Sympatol* hatten ein negatives Ergebnis.

Abb. 5 Au. B. „Adrenalinbildung" aus Phenyläthylamin durch Rindernebenniere. 300 mg Rindernebennierenschnitte in 5 cm³ Phosphat. Vorschüttelung 30 Min. Zusatz von 2 mg Phenyläthylamin. Versuchsdauer in A: 2 Stunden, in B: 3 Stunden. Doppelansätze (I und II). Katzenblutdruck: 0,3 cm³ intravenös. Ergebnis: Die Versuchsansätze „NN/Ph", in denen die Nebenniere auf das Amin eingewirkt hat, sind deutlich wirksamer als die Kontrollen „NN" und „NN + Ph". Aber auch das nachträglich zugefügte Amin („NN + Ph") verstärkt die Wirkung der aminfreien Injektionslösung („NN"): (Zusatz von 2 mg! Phenyläthylamin je Versuchsglas).



Sympatol

Phenyläthylamin. Die Abb. 5 gibt 2 Beispiele für die Versuche mit Phenyläthylamin. Die deutlichen Unterschiede in der Blutdruckwirksamkeit von „NN + Ph" und „NN/Ph" beweisen, daß auch Phenyläthylamin von der Nebenniere in ein pharmakologisch wirksameres, adrenalinähnliches Produkt übergeführt werden kann. Nach unseren Erfahrungen trifft das aber nur für *Rinder*nebenniere zu. In Versuchen mit *Schweine-* und *Meerschweinchen*nebenniere haben wir niemals ein positives Ergebnis erhalten. — Auch in Versuchen mit Rindernebenniere waren die Ergebnisse negativ, wenn an Stelle von Phenyl*äthylamin* Phenyl*oxyäthylamin* angeboten wurde.

Phenyloxyäthylamin

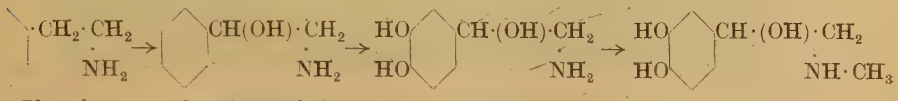
II. Über den physiologischen Weg der Adrenalinsynthese.

1. Das vielleicht überraschendste Resultat der mitgeteilten Untersuchungen ist, daß die Nebenniere, wenn auch anscheinend nicht bei allen Tierarten, Substanzen wie *Phenyläthylamin* und *Tyramin* offenbar als Ausgangsmaterial für die Adrenalinbildung benutzen kann. Denn es folgt daraus, daß *Fermente* in der Nebenniere vorhanden sind, welche den Eintritt von *Oxygruppen* in den Benzolring katalysieren und damit die Umwandlung von *Phenyl*derivaten in *phenol*artige Verbindungen und von *Mono*phenolen in *Di*phenole bewerkstelligen. Daß es solche Fermente im Organismus geben muß, konnte man zwar z. B. aus der seit langem bekannten Tatsache erschließen, daß bei der *Phenolvergiftung Brenzkatechin*abkömmlinge im Harn auftreten, und daß z. B. *Tyrosin* in *Homogentisinsäure* überzugehen vermag. Nach einer Beobachtung von MEDES [8] werden in Fällen von „Tyrosinosis" bei Aufnahme von *Tyrosin* größere Mengen *Dioxyphenylalanin* (Dopa) in den Harn ausgeschieden. Aber über die *Lokalisation* dieser Fermente war, soviel wir sehen, bisher nichts bekannt. *Eine* Stelle im Organismus, an der sie vorkommen, scheinen nach unseren Versuchen die Nebennieren zu sein, wenn auch wahrscheinlich nicht die einzige Stelle. Diese Nebennierenfermente würden also den Übergang *Phenyläthylamin* → *Tyramin* → *Oxytyramin* bewirken. Hierfür scheint notwendig zu sein, daß die aus *Äthylamin* bestehende *Seitenkette* intakt und unverändert ist. Denn auf Grund unserer negativen Ergebnisse mit *Phenyloxyäthylamin* und *Sympatol* ist es wahrscheinlich, daß hier die Umwandlung in die entsprechenden Brenzkatechinderivate —

[8] MEDES, G.: Biochem. Z. **26**, 917 (1932).

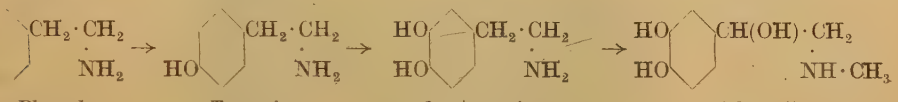
Arterenol bzw. Adrenalin — nicht möglich ist. Es ergibt sich somit, daß die Nebenniere für den Fall, daß sie Phenyläthylamin oder Tyramin als Muttersubstanzen für die Adrenalinsynthese benutzen sollte, zuerst den *Ring* und erst dann auch die *Seitenkette* ummodeln würde, daß eine Adrenalinbildung aus Phenyläthylamin oder Tyramin also *Oxytyramin* als obligate Zwischenstufe zu durchlaufen hätte. Sie würde nicht im Sinne der Reaktionsfolge A, sondern nach dem Reaktionsschema B erfolgen.

A.



Phenyl-äthylamin — Phenyl-oxyäthyl-amin — Arterenol — Adrenalin

B.



Phenyl-äthylamin — Tyramin — Oxytyramin — Adrenalin

Eine Zufallsbeobachtung, die wir machten, als wir einmal die Auswertung nicht wie bisher am *Katzen-* sondern am *Kaninchenblutdruck* vornahmen, spricht ebenfalls für die Annahme, daß zuerst der *Ring* und erst dann die *Seitenkette* verändert wird und dementsprechend Oxytyramin obligate Zwischenstufe ist (Abb. 6). *Oxytyramin* wirkt in den kleinen, hier in Frage kommenden Dosen am Kaninchen blutdruck*senkend*[7]. Wir hofften deshalb, durch Auswertung am *Kaninchen*-blutdruck besonders deutliche Unterschiede zu erhalten zwischen *den* Versuchsansätzen, in denen Oxytyramin der Kontrollösung *erst nachträglich* zugesetzt wurde und mit seiner depressorischen Wirkung den pressorischen Effekt des aus den Nebennierenschnitten hinausdiffundierten präformierten Adrenalins antagonistisch beeinflussen mußte, und *den* Ansätzen, in denen das Nebennierengewebe auf Oxytyramin *eingewirkt* und es in Adrenalin umgewandelt hatte. Die Abb. 6A zeigt, daß das auch tatsächlich zutrifft, indem bei Injektion von „+ Oxy Ty" die blutdrucksenkende Wirkung des unveränderten Oxytyramins nach anfänglichem, durch präformiertes Adrenalin verursachten Blutdruck*anstieg* einen steilen Blutdruck*abfall* bedingt, während die eigentlichen Versuchsansätze „NN/Oxy-Ty", in denen die Nebennieren auf Oxytyramin einwirken konnten, reine Adrenalinwirkung zeigen, die deutlich stärker ist als diejenige der aminfreien Kontrollösung „NN". Die Versuchsansätze mit *Tyramin* verhalten sich nun gerade umgekehrt (Abb. 6B): wo Tyramin *nachträglich* zum Kontrollansatz zugefügt wurde („NN + Ty"), addiert sich die blutdrucksteigernde Wirkung des unveränderten *Tyramins* zu derjenigen des präformierten *Adrenalins* hinzu, und es resultiert ein rein pressorischer Gesamteffekt; demgegenüber zeigen die Ansätze, in denen die Nebenniere auf *Tyramin eingewirkt* hat („NN/Ty"), das gleiche Verhalten wie diejenigen, in denen *Oxytyramin nachträglich zugesetzt* worden war (NN + Oxy-Ty). Es kann also kaum zweifelhaft sein, daß hier die beabsichtigte Adrenalinbildung innerhalb der Versuchszeit nicht über die Oxytyraminzwischenstufe hinausgelangte, die zufällig in diesem Versuch erfaßt wurde, womit dann aber ein weiterer Beweis dafür erbracht wäre, daß bei der Adrenalinsynthese aus niedrigeren Vorstufen die *Seitenkette* erst in Angriff

genommen wird, nachdem der *Ring* zum Brenzkatechinring wurde. Wir möchten diesem Versuch aber keine allzu große Beweiskraft zusprechen, da es uns nicht möglich war, das Ergebnis zu reproduzieren.

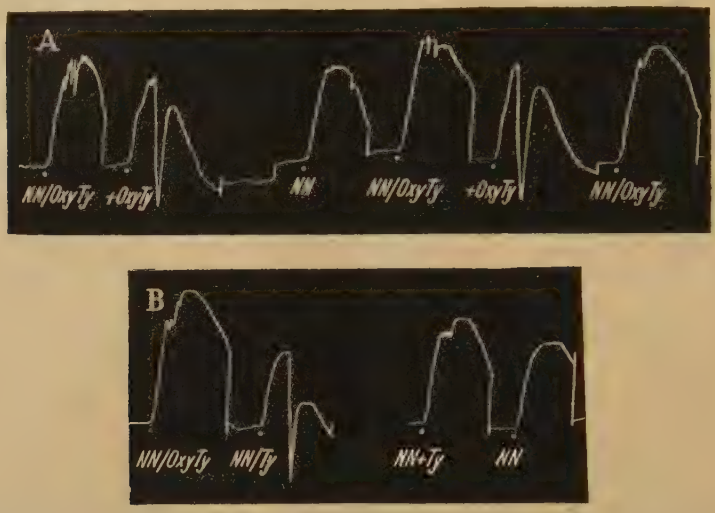
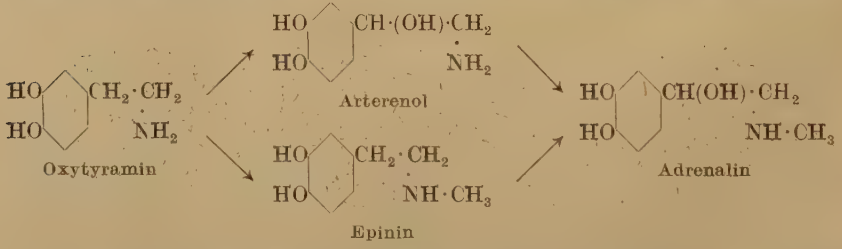


Abb. 6 A u. B. „Adrenalinbildung" aus Oxytyramin. Oxytyraminbildung aus Tyramin. 120 mg Meerschweinchen-Nebennierenschnitte, 4 cm³ Phosphatpuffer. Zusatz von 2 mg Oxytyramin bzw. Tyramin. Kaninchenblutdruck (Urethannarkose): intravenöse Injektion von 0,5 cm³ der Kontrollansätze: „NN" und „NN + OxyTy" bzw. „NN + Ty" der Versuchsansätze: „NN/OxyTy" bzw. „NN/Ty" (s. Text).

2. Die Umwandlung von *Oxytyramin* in *Adrenalin* könnte auf *zwei* Wegen erfolgen; der eine führt über *Arterenol*, der andere über *Epinin*.



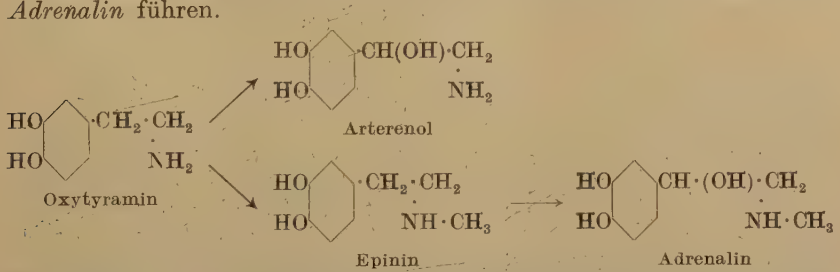
Epinin ist unseres Wissens bisher nicht als körpereigene Substanz nachgewiesen worden. Demgegenüber darf mit Sicherheit angenommen werden, daß *Arterenol* im Organismus gebildet werden kann. Den ersten Beweis hierfür haben wir selbst[9] vor 4 Jahren in einer Arbeit über sympathikomimetische blutdrucksteigernde Substanzen des Harns erbracht, indem wir zeigten, daß Arterenol Komponente

[9] HOLTZ, P., K. CREDNER u. G. KRONEBERG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 228 (1944/47).

des „*Urosympathin*" genannten pressorischen Prinzips und daher *regelmäßiger Harnbestandteil* ist. In der gleichen Arbeit ergaben vergleichende Versuche mit *Nebennierenextrakten* und *reinen* Adrenalin- bzw. Arterenollösungen Anhaltspunkte für die Annahme, daß Arterenol neben Adrenalin in der Nebenniere vorhanden ist, und in einer soeben veröffentlichten Arbeit über „Carotissinusentlastung und Nebennieren" kommen HOLTZ und SCHÜMANN[10] zu dem Ergebnis, daß die im Gefolge einer *Carotissinusentlastung* aus den Nebennieren zur Ausschüttung gelangende Substanz nicht *Adrenalin*, sondern das mit dem „Sympathin E" CANNONS[10a] wahrscheinlich identische *Arterenol* ist, die Nebennieren demnach Bildungsstätten und Depotorgane nicht nur für Adrenalin, sondern auch für Arterenol sind. Unsere Ergebnisse haben eine gewisse Bestätigung und wichtige Erweiterung erfahren durch soeben zu unserer Kenntnis gelangte Untersuchungen U. S. v. EULERS[11], in denen Arterenol in Blut, Milz und Herzmuskel nachgewiesen wird.

Wenn diese Befunde auch direkt beweisen, daß *Arterenol* als körpereigene Substanz im Organismus gebildet werden kann, so zwingen sie andererseits keineswegs dazu, in ihm eine obligate Adrenalinvorstufe zu erblicken, im Gegenteil sprechen *sie vielleicht sogar* eher dafür, daß Arterenol nicht *Vorstufe* und *Intermediärprodukt* ist, sondern als fertiges *Hormon* und *Wirkstoff sui generis* chemisches Endprodukt und Endziel einer in der Nebenniere ablaufenden Biosynthese darstellt.

„*Phylogenetisch*" wären dann beide — *Adrenalin* und *Arterenol* — Endglieder verschiedener und getrennt verlaufender Entwicklungsreihen, die von der gleichen Muttersubstanz ihren Ausgangspunkt nehmen. Die dem Adrenalin und Arterenol gemeinsame Muttersubstanz muß aber *Oxytyramin* sein. Auf der Höhe des Oxytyramins käme es zur Gabelung des Weges nach zwei Richtungen hin: die *eine* würde direkt zum *Arterenol*, die *andere* über *Epinin* als kurzlebige Zwischenstufe zum *Adrenalin* führen.



[10] HOLTZ, P. u. H. J. SCHÜMANN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 49 (1949). [10a] CANNON, W. B. u. Z. M. BACQ: Amer. J. Physiol. **96**, 392 (1931). — CANNON, W. B. u. A. ROSENBLUETH: Amer. J. Physiol. **104**, 557 (1933). — [11] EULER, U. S. v.: J. Physiol. (Brit.) **105**, 26, 38 (1946). Zit. nach Chem. Zbl. **1947**, 56. — Acta Soc. physiol. scand. (D.) **13**, 1 (1946).

Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß der Charakter des Arterenols als *hormonaler Faktor eigener Prägung* nicht unbedingt und von vorneherein ausschließt, daß es trotzdem *Vorstufe* des Adrenalins als des konstitutionell höher stehenden Wirkstoffes ist. Die sich ergebenden Beziehungen zwischen Adrenalin und Arterenol fänden unter diesen Umständen vielleicht ein Analogon in dem Verhältnis von *Thyroxin* und *Dijodtyrosin* in der Schilddrüse.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit über Tyraminderivate als Vorstufen des bei der Addisonschen Erkrankung sich in der Haut bildenden und ablagernden *Pigments* gelangt R. Danneel[12] zu dem Ergebnis, daß von allen als Adrenalinvorstufe in Frage kommenden Aminen nur *Oxytyramin* und *Epinin Chromogennatur* besitzen, d. h. durch Hautfermente in Melanin verwandelt werden können. Die Fähigkeit zur Melaninbildung hat zur Vorbedingung das Fehlen der OH-Gruppe am β-C-Atom der Seitenkette. Weil sie diese Vorbedingung nicht erfüllen, sind Arterenol und Adrenalin selbst, aber auch synthetische Verbindungen wie Aludrin und Corbasil keine Pigmentbildner.

Aber auch diese interessanten Beobachtungen geben keine Handhabe für die Entscheidung, welchen von den beiden *möglichen* Wegen die Adrenalinsynthese nimmt. Jedenfalls wäre für eine Erklärung der bei der Addisonschen Erkrankung auf das Nebennierenmark übergreifenden Störung der Adrenalin- und Pigmentbildung die Annahme einer intermediären Entstehung von *Epinin* nicht erforderlich, da unter den als Adrenalinvorstufe in Frage kommenden Substanzen ja nicht nur *Epinin*, sondern auch *Oxytyramin* als Chromogen des Addison-Pigments zu dienen vermag. Zieht man ferner in Betracht, daß mit dem Nachweis des *Arterenols* als *körpereigene Substanz* der Syntheseweg bis zur Bildung von Arterenol als gesichert anzusehen ist, so braucht man nur noch anzunehmen, daß schon aus Gründen der „*Ökonomie*" des Stoffwechsels nicht *zwei* Reaktionsmöglichkeiten mit den dazugehörigen Fermentsystemen zur Verfügung gestellt werden, wo die *eine* genügen würde, das Ziel zu erreichen —, um zu der Vorstellung zu gelangen, daß der *physiologische* Weg der Adrenalinsynthese doch über Arterenol und nicht über Epinin führt.

3. In jedem Fall besitzt *Oxytyramin* eine *Schlüsselstellung* in der Reaktionsfolge, die der Adrenalinsynthese zugrunde liegt, und die Frage nach seiner *Entstehung* gewinnt besondere Bedeutung. Nach den experimentell fundierten Darlegungen des ersten Abschnitts können *Phenyläthylamin* und *Tyramin* wohl unzweifelhaft von der *Nebenniere selbst* in Oxytyramin übergeführt werden. Zweifelhaft ist aber,

[12] Danneel, R.: Z. Naturforsch. **1**, 87 (1946).

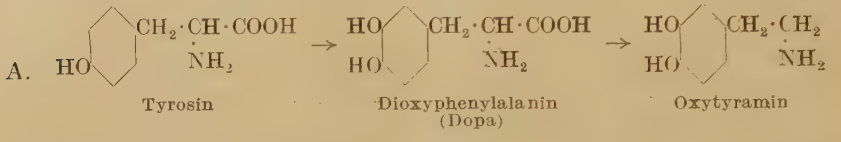
ob dieser Weg den tatsächlich vom Organismus eingeschlagenen *physiologischen* darstellt. *Dagegen* spricht die offensichtlich nur geringe „biologische Sicherung" dieses Weges. *Phenyläthylamin* konnte in unseren Versuchen nur von Rindernebenniere, nicht z. B. von Schweine- und Meerschweinchennebenniere als Substrat benutzt werden. Auch mit *Tyramin* erhielten wir ebenso wie SCHULER in seinen Versuchen nicht selten negative Ergebnisse. Die Diskrepanz zwischen der unter physiologischen Verhältnissen anscheinend absolut gesicherten, vom *Oxytyramin* zum *Adrenalin* verlaufenden Wegstrecke und der wenig gesicherten Wegstrecke, die zur *Entstehung* von Oxytyramin führen soll, läßt die Frage nach anderen Entstehungsmöglichkeiten für die „Schlüsselsubstanz" Oxytyramin aufwerfen. Eine andere, durch frühere eigene Untersuchungen[13] absolut gesicherte Entstehungsmöglichkeit für Oxytyramin ist in der *Decarboxylierung* der Aminosäure Dioxyphenylalanin (Dopa) durch die von uns[13] in Niere und Leber aller Säugetiere entdeckte *Dopadecarboxylase* gegeben. Wir haben in früheren Veröffentlichungen wiederholt darauf aufmerksam gemacht, daß die Dopadecarboxylase die weitaus wirksamste aller Aminosäurendecarboxylasen ist. Läßt man z. B. in der WARBURG-Apparatur Nierenextrakt auf einige Milligramm *Dopa* einwirken, so kann man die Kohlensäureabspaltung aus der Aminosäure an den positiv werdenden Manometerausschlägen direkt verfolgen und feststellen, daß in 20—30 Min. fast die gesamte Substratmenge umgesetzt wurde. Macht man den gleichen Versuch mit *Tyrosin* oder *Phenylalanin*, so kommt es auch bei einer zwei- oder dreifach längeren Versuchsdauer zu keiner manometrisch meßbaren CO_2-Abgabe. — Injiziert man einem Menschen oder Tier *Dioxyphenylalanin*, so tritt kurz darauf ein beträchtlicher Anteil der Aminosäure als *Oxytyramin* im Harn auf[14]. Es ist nicht einzusehen, welche physiologische Aufgabe man der Dopadecarboxylase als der wirksamsten aller Aminosäuredecarboxylasen zuweisen soll wenn nicht die: durch Decarboxylierung von Dopa *Muttersubstanz* für die *biologische Adrenalinsynthese* zu liefern und damit selbst zu einem wichtigen Hilfsferment der Adrenalinbildung im Körper zu werden.

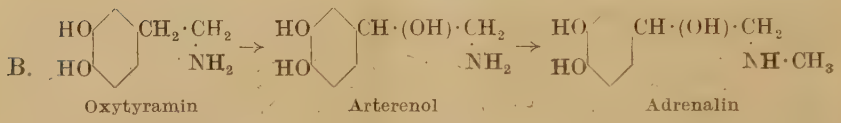
Der jetzt zu erwartende Einwand, die Aminosäure *Dioxyphenylalanin* als Substrat des so wirksamen Fermentes sei bisher im tierischen und menschlichen Organismus nicht nachgewiesen worden, kann demgegenüber nicht allzu schwer wiegen. Wir erinnern an unsere früheren Erörterungen über das Vorkommen von Dopa in der Natur und möchten hier nur darauf hinweisen, daß auch im Menschen- und Tierkörper ganz sicher die Möglichkeit seiner intermediären Entstehung aus Tyrosin gegeben ist[14]. Seine *chemische* Erfassung jedoch in den Körper-

[13] HOLTZ, P., R. HEISE u. K. LÜDTKE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 87 (1938). — [14] HOLTZ, P., K. CREDNER u. W. KOEPP: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942).

säften und im Gewebe oder gar sein Nachweis als Eiweißbaustein würde sehr erschwert werden, einmal durch die bei Sauerstoffgegenwart leicht erfolgende Oxydation zu melaninartigen und huminartigen Produkten, sodann wegen der großen Aktivität der Dopadecarboxylase, die es wohl kaum zur Anhäufung nennenswerter Mengen kommen ließe.

Der *physiologische Weg* der *Adrenalinsynthese* im Organismus, der *Hauptweg* der biologischen Adrenalinbildung wäre nach unserer Auffassung demnach folgendermaßen zu formulieren:





Die Reaktionsfolge A spielt sich in *Leber* und *Niere* ab, die Reaktionsfolge B in den *Nebennieren*.

Der zentralen Bedeutung des *Oxytyramins*, seiner „Schlüsselstellung" für die Adrenalinsynthese würde — in diesem Falle unter *Durchbrechung* des „Ökonomieprinzips" des Stoffwechselgeschehens — die zweifache Sicherung seiner fermentativen Bildung entsprechen: neben der auf dem *„physiologischen Hauptweg"* liegenden Entstehung aus den *Aminosäuren* — *Tyrosin*, *Dopa* — unter Mitwirkung der Dopadecarboxylase die als *„Nebenweg"* in einzelnen Fällen bestehende Möglichkeit einer Bildung aus den *Aminen* — *Phenyläthylamin*, *Tyramin* — in der Nebenniere.

Zusammenfassung.

1. Schüttelt man in Phosphatpuffer suspendierte *Nebennierenschnitte* von *Schwein*, *Rind* oder *Meerschweinchen* mehrere Stunden in sauerstoffhaltiger Atmosphäre mit *Oxytyramin*, *Tyramin* oder *Phenyläthylamin*, so werden die Amine in Substanzen mit stärkerer blutdrucksteigernder Wirkung, wahrscheinlich in *Adrenalin* umgewandelt. Die Umwandlung erfolgt bei Oxytyramin und Tyramin durch die Nebenniere aller drei Tierarten — mit Tyramin allerdings nicht so regelmäßig wie mit Oxytyramin —, bei Phenyläthylamin hingegen nur durch Rindernebenniere.

2. Versuche mit *Sympatol* und *Phenyloxyäthylamin* hatten ein negatives Ergebnis. Es wird daraus gefolgert, daß bei der Überführung von Phenyläthylamin und Tyramin in Adrenalin zuerst der *Ring*, erst dann die *Seitenkette* angegriffen wird, da die Aufoxydation

des Benzol- bzw. Phenolringes zum Brenzkatechinring offenbar die Intaktheit der aus Äthylamin bestehenden Seitenkette zur Voraussetzung hat, d. h. aber, daß die Adrenalinbildung aus diesen beiden Aminen über *Oxytyramin* als obligates Intermediärprodukt führt.

3. Auf die „*Schlüsselstellung*" des *Oxytyramins* in der Reaktionsfolge, die der Adrenalinsynthese zugrunde liegt, wird hingewiesen. Unbeschadet der Möglichkeit seiner Bildung aus Phenyläthylamin und Tyramin in der *Nebenniere* wird für den wichtigsten Weg, auf dem es im Organismus entsteht, die *Decarboxylierung* der Aminosäure Dioxyphenylalanin (Dopa) durch die *Dopadecarboxylase* der *Leber* und *Niere*, die wirksamste aller Aminosäuredecarboxylasen, gehalten.

4. Der Weg vom Oxytyramin zum Adrenalin kann über *Arterenol* oder *Epinin* gehen. Die Möglichkeit einer biologischen *Arterenolsynthese* ist durch den Nachweis des Arterenols als körpereigene Substanz gesichert. Es werden auch noch andere Gründe angeführt, die es wahrscheinlich machen, daß die Adrenalinsynthese über *Arterenol* und nicht über *Epinin* führt.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Adrenalin, Arterenol und Epinin auf Blutdruck, Milzvolumen, Darm und Blutzucker.

Von

Hans-Joachim Schümann.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1948.)

Im Rahmen anderer Untersuchungen des Instituts stellte es sich als notwendig heraus, *Vergleichswerte* der *Blutdruck-*, *Blutzucker-* und *Darmwirkung* der 3 Sympathikomimetika zur Verfügung zu haben, von denen *Arterenol* in der vorstehenden Arbeit von Holtz und Schümann[1] als chemischer Überträgerstoff sympathischer Nervenerregungen und Nebennierenhormon, *Epinin* neben Arterenol in Untersuchungen von Holtz und Kroneberg[2] über die biologische Adrenalinsynthese als in Frage kommende Vorstufe besondere Bedeutung gewonnen hatte. Ich habe deshalb einige Versuche an den entsprechenden Testobjekten ausgeführt, über deren Ergebnis im folgenden berichtet werden soll.

Versuchsergebnisse.

1. Blutdruckwirkung.

Methodik. Zu den Versuchen wurden *Katzen* von 2—3 kg Gewicht verwandt. Als Narkotikum wurde in den meisten Fällen Pernocton benutzt. (0,8 cm³ je Kilogramm der 10%igen Lösung ad usum veterinarium intramuskulär.) Vor Versuchsbeginn wurde 1 mg je Kilogramm Atropinum sulfuricum intramuskulär gegeben. Der Blutdruck wurde in der Arteria femoralis gemessen. Die Injektionen erfolgten in die Vena iugularis. Das in den Versuchen benutze *Arterenol* war die d,l-Verbindung des salzsauren Salzes, das uns in dankenswerter Weise von Herrn Prof. Schaumann, Höchst, vor längerer Zeit überlassen worden war. Das benutzte *Epinin* war eine 1%ige im Handel befindliche Lösung des schwefligsauren Salzes, für deren Überlassung wir Herrn Prof. Danneel, Göttingen, bestens danken.

Die Blutdruckwirkung des *Arterenols* ist schon wiederholt untersucht und mit derjenigen des Adrenalins verglichen worden. In Versuchen an *Hunden* kommt Schultz[3] zu dem Ergebnis, daß die

[1] Holtz, P. u. H. J. Schümann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 49 (1949).
[2] Holtz, P. u. G. Kroneberg: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 150 (1949).
[3] Schultz, W. H.: Hygienic Laboratory, Bull. **55** (1909). Zit. nach 4.

blutdrucksteigernde Wirkung der beiden Substanzen gleich stark ist. Demgegenüber finden Barger und Dale[4] in ihren bekannten Untersuchungen über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung in der Gruppe sympathikomimetischer Amine, daß Arterenol sich am *Katzenblutdruck* häufig als etwas stärker pressorisch erweist. Als Verhältnis der Wirksamkeit Adrenalin : Arterenol geben sie 1:1,5 an, machen jedoch darauf aufmerksam, daß in manchen Versuchen oder auch im späteren Verlauf ein und desselben Versuchs dieses Verhältnis sich direkt umkehren kann.

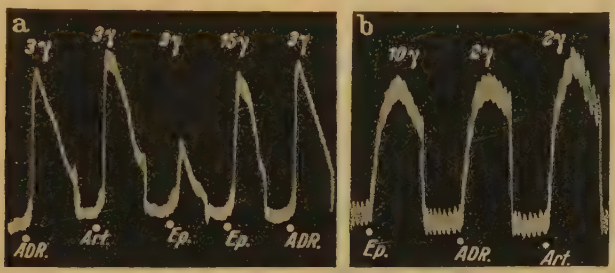


Abb. 1a u. b. Blutdruckwirksamkeit von Adrenalin, Arterenol, Epinin. Katze, 3 kg. Pernoctonnarkose. Arterenol ist etwas wirksamer, Epinin 5mal weniger wirksam als Adrenalin. *ADR* Adrenalin; *Art.* dl-Arterenol; *Ep.* Epinin.

Die Abb. 1a und b gibt in 2 Versuchen an verschiedenen Versuchstieren ein Beispiel für das von uns in den meisten Fällen beobachtete Verhalten. Hiernach ist Arterenol *etwas wirksamer* als Adrenalin. Das umgekehrte Verhältnis der Wirksamkeit habe ich nie beobachtet, auch nicht, wenn der Vergleich im späteren Verlauf des Versuchs wiederholt wurde. Andererseits ist anzunehmen, daß in Analogie zu dem pharmakologischen Verhalten der optischen Isomeren des Adrenalins *l-Arterenol*, das mir und offenbar auch den früheren Untersuchern nicht zur Verfügung stand, weit wirksamer ist als d-Arterenol, so daß die mit *dl-Arterenol* erhaltenen Wirkungen dann praktisch auf dem Gehalt des Racemats an l-Komponente beruhen und bei Verwendung reinen l-Arterenols doppelt so stark sein würden. *l-Arterenol* wäre dann am Katzenblutdruck mindestens doppelt so wirksam wie *l Adrenalin*.

Epinin ist demgegenüber weit weniger blutdruckwirksam. Die Abb. 1a zeigt, daß der pressorischen Wirkung von *3 γ Adrenalin* bzw. Arterenol erst *15 γ Epinin* ungefähr äquivalent sind. Von Epinin sind also 5fach größere Mengen als von dl-Arterenol oder l-Adrenalin erforderlich,um die gleiche Blutdrucksteigerung zu erzielen. Dasselbe Wirksamkeitsverhältnis ergibt sich aus dem Versuch der Abb. 1b, in dem *10 γ Epinin* mit *2 γ Adrenalin* äquivalent sind.

[4] Barger, G. u. H. H. Dale: J. Physiol. (Brit.) **41**, 19 (1910).

2. *Milzwirkung.*

In einer voraufgegangenen Arbeit[1] über Arterenol als ein gegen Adrenalin abgrenzbares *Hormon der Nebenniere*, das auf den Reiz einer *Karotissinusentlastung* hin in erhöhtem Maße sezerniert wird, waren Versuche über die Beeinflussung des *Milzvolumens* von besonderer Bedeutung. Die Milzwirkung des Adrenalins und Arterenols war deshalb von Interesse. Das Milzvolumen wurde mit Hilfe eines zylinderförmigen Glasonkometers und einer MAREYschen Kapsel registriert.

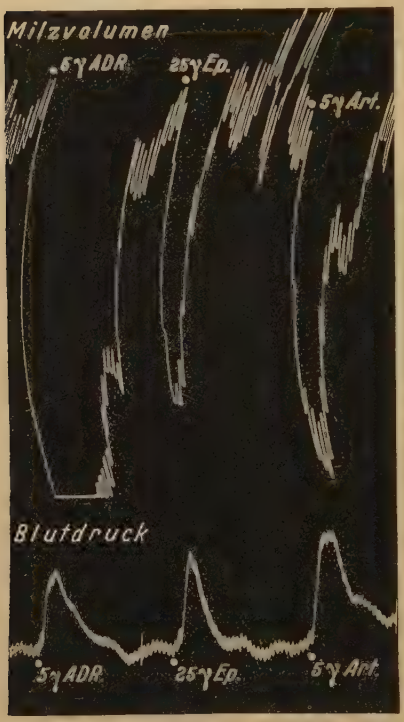


Abb. 2. Beeinflussung des Milzvolumens durch Adrenalin, Arterenol, Epinin (Ausschlag des registrierenden Hebels nach unten!). Katze, 2,6 kg. Pernoctonnarkose. Adrenalin ist wirksamer als Arterenol, Arterenol ist wirksamer als Epinin in fast blutdruckäquivalenter Dosierung.

Aus der Abb. 2, die einen Versuch mit Adrenalin, Arterenol und Epinin darstellt, geht hervor, daß *Adrenalin* die weitaus stärkste Milzwirkung besitzt. Obwohl seine *blutdrucksteigernde* Wirksamkeit in diesem Versuch am geringsten ist, verursacht es die stärkste *Milzkontraktion*, so daß die Exkursionsfähigkeit des registrierenden Zeigers überschritten wird.

Am schwächsten milzwirksam ist *Epinin*, das in einer Dosierung, welche sogar einen stärker *pressorischen* Effekt als Adrenalin ausübt, eine erheblich geringere *Milzkontraktion* verursacht. Die Milzwirkung des *Arterenols* ist ebenfalls schwächer als die des Adrenalins, wenn auch bemerkt werden muß, daß der Unterschied, wie ihn der vorliegende Versuch zeigt, nicht so ausgeprägt ist, wenn man *kleinere* Dosen, z. B. 0,5 oder 1 γ injiziert.

3. *Darmwirkung.*

Methodik. Die Versuche wurden am *Katzendarm in situ* nach der von STRAUB[5] angegebenen Methode ausgeführt. Nähere Angaben finden sich in der schon erwähnten Arbeit von HOLTZ und SCHÜMANN[1]. Als Narkotikum wurde wiederum Pernocton verwandt.

[5] STRAUB, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **169**, 1 (1933).

Der *Darm* ist schon oft als besonders empfindliches Testobjekt zum Nachweis von Adrenalin benutzt worden. Nach neueren Befunden[6] soll der *Katzendarm* eine besonders hohe Adrenalinempfindlichkeit besitzen. Die Abb. 3B zeigt, daß bei der mehr als 3 kg schweren Katze schon *0,5 γ Adrenalin* eine deutliche Darmhemmung verursacht, die sich in Tonusabfall und kleiner werdenden Pendelbewegungen äußert. Bei einer Dosierung von 2 γ Adrenalin (Abb. 3A) kommt es zu einem länger dauernden vollständigen Sistieren der Eigenbewegungen. Die Wirkung des *Arterenols* auf den Darm ist weit schwächer. Ein Vergleich der beiden Substanzen, wie er in der Abb. 3B durchgeführt wurde, ergibt, daß Arterenol 4—5mal schwächer wirksam ist als Adrenalin.

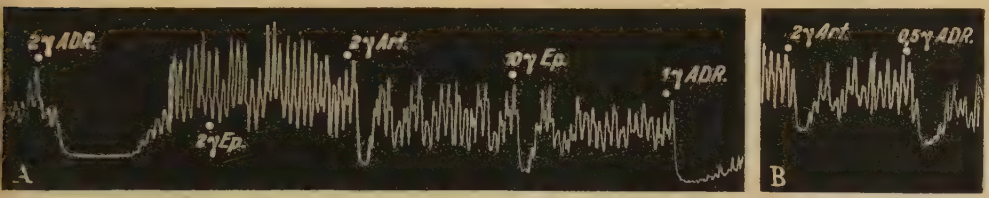


Abb. 3A u. B. Darmwirksamkeit von Adrenalin, Arterenol, Epinin. Katze, 3 kg. Darm in situ. A Arterenol ist 4—5mal wirksamer als Epinin, B Adrenalin ist 4—5mal wirksamer als Arterenol.

Die Hemmungswirkung von 2 γ Arterenol ist etwas schwächer als diejenige von 0,5 γ Adrenalin.

Die Darmwirkung des *Epinins* ist noch weit schwächer als diejenige des Arterenols. Aus der Abb. 3A ist zu ersehen, daß die Injektion von 2 γ Epinin praktisch ohne jede Wirkung bleibt. Erst die 5fach höhere Dosierung von 10 γ verursacht eine Tonussenkung, welche der durch 2 γ Arterenol verursachten vergleichbar ist. Auf Adrenalin bezogen ergibt sich somit als *Wirksamkeitsverhältnis am Darm*, daß *Arterenol* ungefähr 5mal, *Epinin* ungefähr 25mal schwächer wirksam ist.

4. Blutzuckerwirkung.

Methodik. Die Versuche wurden an *Kaninchen* von 2—3 kg Körpergewicht gemacht, die 16 Stunden lang gehungert hatten. Jedes der 3 zu prüfenden Sympathikomimetika wurde, nachdem in Vorversuchen der geeignete Dosierungsbereich festgestellt worden war, in je 3 Versuchen an 3 verschiedenen Tieren für jede Dosis ausgetestet.

Die *Blutzuckerbestimmungen* wurden als Doppelbestimmungen nach Hagedorn-Jensen ausgeführt. Die zu prüfenden Substanzen löste ich in physiologischer Kochsalzlösung und injizierte sie subcutan. Die injizierten Flüssigkeitsvolumina betrugen 1 cm³ je Kilogramm.

100 γ/kg *Adrenalin* hatte sich als gute Vergleichsdosis erwiesen. Nach dieser Dosis steigt der Blutzuckergehalt auf 260—270 mg-% an.

[6] Achutin, M. N.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **171**, 668 (1933).

Die Zeit, in der die Kurve den Höhepunkt erreicht, schwankt bei den einzelnen Tieren zwischen 2 und 3 Stunden; nach 5—6 Stunden ist sie wieder zum Ausgangspunkt zurückgekehrt (Abb. 4 und 5). *Arterenol*

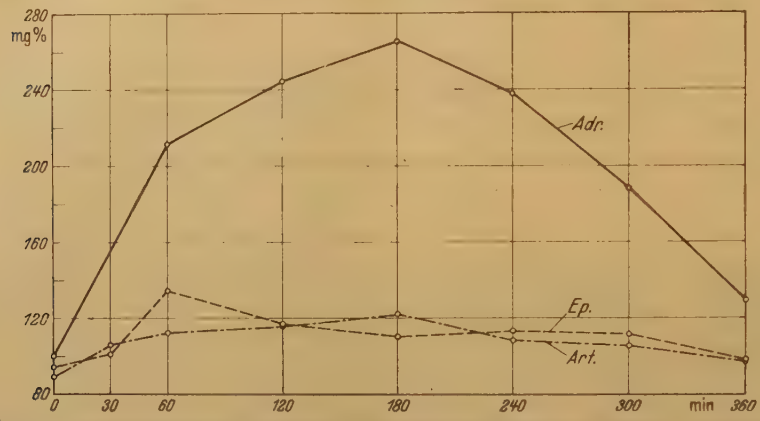


Abb. 4. Hyperglykämische Wirkung von Adrenalin, Arterenol, Epinin. Kaninchen 2,2—2,4 kg. Subkutane Injektion von: Adr. = 100 γ/kg Adrenalin; Art. = 500 γ/kg d-, l-Arterenol; Ep. = 500 γ/kg Epinin. Blutzucker in mg-%. Arterenol und Epinin sind trotz 5fach höherer Dosierung weit weniger wirksam als Adrenalin.

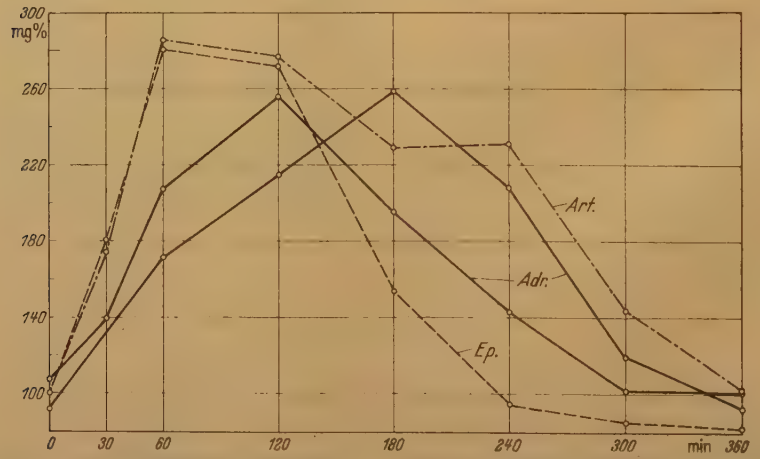
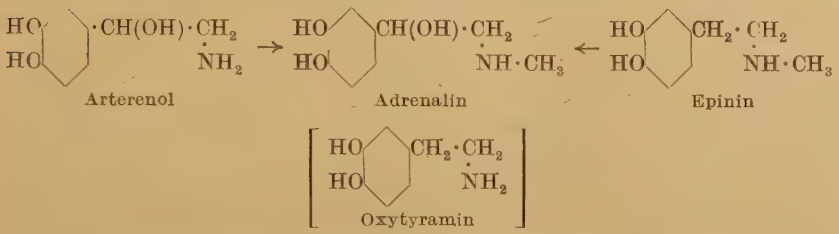


Abb. 5. Hyperglykämische Wirkung von Adrenalin, Arterenol, Epinin. Kaninchen 2,1—2,4 kg. Subkutane Injektion von: Adr. = 100 γ/kg Adrenalin; Art. = 2000 γ/kg d-, l-Arterenol; Ep. = 2000 γ/kg Epinin. Arterenol und Epinin sind gleichwirksam, beinahe 20mal weniger wirksam als Adrenalin.

und *Epinin* sind in der gleichen Dosierung gänzlich wirkungslos. Erst die *5fach* höhere Dosis von 500 γ/kg hat eine ganz leichte hyperglykämische Wirkung, wie sie in den beiden Kurven der Abb. 4 zum Ausdruck kommt. Der Blutzuckerspiegel wird um 30—40 mg-% erhöht.

Um gleich starke hyperglykämische Wirkungen wie mit Adrenalin zu erhalten, muß man die beiden adrenalinähnlichen Brenzkatechinderivate in fast *20fach* höherer Dosierung geben. Die Abb. 5 gibt ein Beispiel für diese Versuche mit 2000 γ/kg Epinin bzw. Arterenol. Der Gipfelpunkt der Blutzuckerkurve wird schon nach 1 Stunde erreicht und liegt auch etwas höher als in den Versuchen mit der 20fach kleineren Adrenalinmenge. Epinin und Arterenol sind praktisch gleich wirksam.

Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung.



Die 3 Sympathikomimetika unterscheiden sich chemisch voneinander durch die verschiedenartige Substitution der *Seitenkette:* die funktionell wichtigen und für die pharmakologischen Wirkungsunterschiede verantwortlichen chemischen Gruppen sind die OH- und die CH_3-Gruppe.

Das *Adrenalinmolekül* enthält beide Gruppen. Es ist die an allen Testobjekten wirksamste Verbindung mit alleiniger Ausnahme vielleicht des *Katzenblutdrucks*, an dem Arterenol sich als etwas wirksamer erwies. Hier scheint demnach die *Methylgruppe* hemmend zu wirken. Es ist eigenartig, daß dieser Hemmungseffekt der CH_3-Gruppe auf die *blutdrucksteigernde* Wirkung des Adrenalins an der *Milz* nicht zum Ausdruck kommt, im Gegenteil die milzkontrahierende Wirkung des *Arterenols* durch das Hinzutreten der Methylgruppe fraglos deutlich verstärkt wird, so daß Adrenalin hier dem Arterenol als dem entmethylierten Derivat überlegen ist. Das OH-freie *Epinin* ist am Blutdruck 5mal schwächer wirksam. Das Hinzutreten der OH-Gruppe bedeutet also eine 5fache Verstärkung der pressorischen Wirksamkeit. Andererseits ist auch die Methylgruppe, wenn sie *alleiniger* Substituent der Seitenkette ist, von Bedeutung für die pressorische Wirksamkeit, wie der Vergleich mit *Oxytyramin* zeigt, das als entmethyliertes Epinin ohne jede Substitution der Seitenkette, wie aus früheren Versuchen von Holtz, Credner und Koepp[7] hervorgeht, ungefähr 30mal schwächer blutdrucksteigernd wirkt als Adrenalin.

Für die *darmhemmende* und für die *hyperglykämische* Wirkung sind beide Gruppen — die Oxy- und die Methylgruppe — von Bedeutung. Am *Darm* wirkt *Arterenol* 5mal, *Epinin* 25mal schwächer als Adrenalin. Die darmhemmende Wirkung ist also weit mehr eine Funktion der OH- als eine solche der CH_3-Gruppe: der Eintritt der OH-Gruppe in die Seitenkette der Methylverbindung (*Epinin*) bedeutet eine 25fache, der Eintritt der CH_3-Gruppe in die Seitenkette der Oxyverbindung (*Arterenol*) nur eine 5fache Verstärkung der inhibitorischen Darmwirkung. Auch hier erweist sich das nicht substituierte Oxytyramin als weit schwächer wirksam[7].

[7] Holtz, P., K. Credner u. W. Koepp: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942).

Die *hyperglykämische* Wirkung ist bei *Arterenol* und *Epinin* gleich stark ausgeprägt, beide sind ungefähr 20mal schwächer wirksam als Adrenalin. Für die Blutzuckerwirkung kommt also *beiden* Gruppen die gleiche funktionelle Wertigkeit zu: sie komplettieren sich gegenseitig um den gleichen Betrag zu dem 20fach wirksameren Adrenalin. Auch das steht im Einklang damit, daß das *Fehlen* beider Gruppen eine starke Abnahme der hyperglykämischen Wirksamkeit bedeutet: *Oxytyramin* ist nach Untersuchungen von Holtz und Credner[8] am Kaninchen 100mal weniger wirksam als Adrenalin. Würde in gleicher Weise, wie oben für die *Blutdruckwirkung* diskutiert, auch die *Blutzuckerwirkung* von dl-Arterenol praktisch nur auf der l-Komponente beruhen, so wäre *l-Arterenol* glykämisch doppelt so wirksam wie *Epinin* und die OH-Gruppe der Seitenkette von größerer Bedeutung für das Zustandekommen der Blutzuckerwirkung als die CH_3-Gruppe.

Zusammenfassung.

Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit von *Adrenalin*, *Arterenol* und *Epinin* hatten folgendes Ergebnis:

1. Mit Ausnahme des Katzenblutdrucks, an dem Arterenol etwas wirksamer als Adrenalin war, erwies *Adrenalin* sich als das wirksamste Sympathikomimetikum. Seine *blutdrucksteigernde* Wirkung übertrifft diejenige des *Epinins* um das *5fache*. Die *milzkontrahierende* Wirkung nimmt ab in der Reihenfolge Adrenalin → Arterenol → Epinin.

2. Am *Darm* wirkt *Arterenol* 5mal, *Epinin* 25mal schwächer als Adrenalin.

3. Am *Blutzucker* sind Arterenol und Epinin gleich wirksam. Beide wirken ungefähr 20mal schwächer als Adrenalin.

4. Die sich ergebenden Beziehungen zwischen *chemischer Konstitution* und *pharmakologischer Wirkung* werden erörtert.

[8] Holtz, P. u. K. Credner: Hoppe-Seylers Z. **280**, 9 (1944).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

Über die Potenzierung der Adrenalinwirkung durch Spartein.

Von

Peter Holtz und Hans-Joachim Schümann.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1948.)

Zwei pharmakologische Eigenschaften des *Sparteins*, des Haupt*alkaloids* des Besenginsters (Spartium scoparium), sind es, die eine experimentell fundierte klinische Anwendung möglich erscheinen lassen: die *Herzwirkung* und die *Uteruswirkung*. Vor allem von der französischen Klinik wird Spartein in Fällen unregelmäßiger Herztätigkeit, bei Herzarhythmien angewandt, denen Überleitungsstörungen zugrunde liegen. Der Indikationsbereich deckt sich zum Teil mit demjenigen des in ähnlichen Fällen anderswo häufiger benutzten *Chinidins*.

Die experimentelle Grundlage dieser Therapie ist durch die Untersuchungen von Hildebrandt[1] an Frosch- und Meerschweinchenherzen über die Hemmungswirkung des Sparteins auf das *Reizleitungssystem*, seine regularisierende Wirkung bei Vorhof- und Kammerflimmern gegeben. Die *uteruserregende* Wirkung wurde erst später in Untersuchungen von Kreitmair[2] am Katzenuterus in situ beobachtet und daraufhin auch klinisch bei Wehenschwäche anscheinend mit Erfolg ausgenutzt[3]. In Versuchen am isolierten Katzen- und Kaninchenuterus wie auch am isolierten Kaninchen*darm* wirkten Sparteinkonzentrationen von 1:10000 und höher kontrahierend.

Neben diesen zum Teil schon praktisch angewandten, *direkten* Wirkungen kommt dem Spartein nach Berichten französischer Autoren[4] eine interessante *indirekte* Wirkung zu: eine *Potenzierung* der Blutdruckwirkung des *Adrenalins*. Diese sensibilisierende Wirkung auf die durch Adrenalin verursachte Blutdrucksteigerung konnte von Graubner und Kraus[5] in Versuchen an dezerebrierten Katzen und mit Chloralose narkotisierten Hunden bestätigt werden. Für die Erkennung des *Mechanismus* und des *Angriffspunktes* der Wirkung sind 2 Beobachtungen wichtig: 1. der Sensibilisierungseffekt, der darin

[1] Hildebrandt, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **101**, 136 (1924). — Bohnenkamp, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **102**, 244 (1924). — [2] Kreitmair, W. u. W. Sieckmann: Mercks Jber. **50**, III (1936). — [3] Kleine, O.: Mercks Jber. **52**, 5 (1938); Klin. Wschr. **1939**, 336. — [4] Mercier, F.: C. r. Acad. Sci. **185**, 1162 (1927). — Balancard, J. et C. Sigal: C. r. Soc. Biol. **110**, 45 (1932). Hazard, R.: C. r. Soc. Biol. **112**, 550, 768 (1933); **113**, 1089 (1933). — [5] Graubner, W. u. H. Kraus: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **184**, 235 (1937).

zum Ausdruck kommt, daß nach einer voraufgegangenen Sparteininjektion Adrenalin den Blutdruck stärker und länger erhöht als vorher, tritt nicht an den Gefäßen der *isolierten*, künstlich durchströmten Extremität auf; 2. die Potenzierung der Blutdruckwirkung fällt nach Ausschaltung der *Nebennieren* fort. Die *nikotinähnliche* Affinität des Sparteins zu *Ganglienzellen* macht verständlich, daß es, wie von den Autoren in besonderen Versuchen festgestellt wurde, unter der Einwirkung wiederholt applizierter größerer Alkaloidmengen zur Verarmung der Nebennieren an Adrenalin kommt; es wird hierdurch aber unseres Erachtens nicht verständlich, auf welche Weise eine der Hormonverarmung der Nebennieren ja doch wohl zugrunde liegende *Ausschüttung von Adrenalin* ursächliche Bedeutung für das Zustandekommen des Sensibilisierungseffektes gewinnen soll. Von einer durch Spartein veranlaßten Adrenalinausschüttung wäre zu erwarten, daß sie im Anschluß an die Sparteininjektion zu einem Blutdruckanstieg führte und damit eine unter Umständen gar nicht vorhandene *Eigenwirkung* des Alkaloids vortäuschte, so daß die *gleichzeitige* Injektion von Spartein und Adrenalin wirksamer sein müßte als die Injektion von Adrenalin allein; es ist aber nicht einzusehen, wie auf diese Weise die Wirkung *nachträglich* injizierten, d. h. nach dem Abklingen der Spartein-„Eigenwirkung" injizierten Adrenalins gesteigert werden sollte. Eigenartig ist sodann, daß nach GRAUBNER und KRAUS die sensibilisierende Sparteinwirkung zwar an der *decerebrierten Katze*, nicht aber am *narkotisierten Hund* mit sonst *intaktem Nervensystem* durch Nebennierenexstirpation aufgehoben wird, und es bedeutet keine weitere Klärung, wenn die Autoren dann zusammenfassend feststellen, daß für die Sensibilisierung „der sympathische Apparat der Nebennieren eine wichtige Rolle spielt".

Wir haben versucht, trotz der negativen Ergebnisse von GRAUBNER und KRAUS am *isolierten Gefäßgebiet* der künstlich durchströmten Extremität, in Versuchen an *isolierten Organen* — Uterus und Darm — näheren Aufschluß über das Wesen der Potenzierung der Adrenalinwirkung durch Spartein zu erhalten. In den Untersuchungen von HAZARD[4] findet sich der Hinweis, daß für die Potenzierung der Blutdruckwirkung des Adrenalins die *Intaktheit des Vagus* von Bedeutung ist: nach Vagusdurchschneidung wird der Sensibilisierungseffekt kleiner. Wir haben deshalb in Versuchen am isolierten *Darm* auch die Beeinflußbarkeit der *Acetylcholin-* und *Pilokarpin*wirkung durch Spartein untersucht.

Versuche.

Methodik.

Die Versuche wurden am *isolierten Kaninchenuterus* sowie am isolierten *Kaninchen-* und *Meerschweinchendarm* nach der Methode von MAGNUS gemacht.

Das Versuchsgefäß enthielt 20 cm³ Tyrodelösung und befand sich in einem Wasserthermostaten bei 37° C. Spartein kam als Sparteinsulfat zur Anwendung, dessen wäßrige Lösungen vor dem Versuch mit Natronlauge neutralisiert wurden.

1. Die Potenzierung der Adrenalinwirkung am Kaninchenuterus durch Spartein.

In der schon erwähnten Arbeit von KREITMAIR[2] wird angegeben, daß Spartein *an sich* in Konzentrationen von 1:10000 und höher am

Abb. 1. Potenzierung der Adrenalinwirkung durch Spartein am Kaninchenuterus. Eine an sich wirkungslose Sparteinkonzentration verstärkt die Erregungswirkung des Adrenalins. Isolierter Kaninchenuterus in 20 cm³ Tyrodebad. *ADR.* Adrenalin; *Sp.* Spartein.

isolierten *Katzen-* und *Kaninchenuterus* erregend wirkt. In späteren Untersuchungen von ZIPF und TRILLER[1] waren Sparteinverdünnungen von 1:50000 am virginellen *Meerschweinchenuterus* wirkungslos, bei 1:25000 trat eine Verstärkung der Kontraktion auf und erst bei 1:10000 kam es zu einer Tonuserhöhung. Mit diesen Befunden steht im Einklang, daß in unserem in der Abb. 1 dargestellten Versuch 0,5 cm³ Spartein 1:10000, d. h. eine Endkonzentration von 1:200000 in dem 20 cm³ fassenden Versuchsgefäß keine *direkte* Uteruswirkung hat. Die kleine, an sich wirkungslose Sparteinmenge genügt aber, um die Kontraktionswirkung des *Adrenalins* deutlich zu verstärken. Auch nach dem Auswaschen durch zweimaligen Wechsel der Badflüssigkeit ist der Sensibilisierungseffekt noch ungeschwächt erhalten. Durch mehrfach wiederholtes Auswaschen läßt er sich dann aber beseitigen, um nach erneuter Einwirkung von Spartein wieder aufzutreten (Abb. 2).

Aus Versuchen am *Kaninchendarm*, für die in der Abb. 3 ein Beispiel gegeben wird, geht hervor, daß im Gegensatz zur *Erregungswirkung*

[1] ZIPF, H. F. u. G. TRILLER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 536 (1942/43).

des Adrenalins am *Uterus* seine *Lähmungswirkung* am *Darm* durch Spartein nicht beeinflußt wird. Die *Eigenwirkung* des Sparteins, das in diesem Versuch mit 0,5 mg und 2 mg in Konzentrationen von 1:40000 bzw. 1:10000 vorliegt, besteht in einer flüchtigen Hemmung der Darmkontraktionen, an die sich im Falle der höheren Dosierung (2 mg) eine leichte Erregungswirkung anschließt.

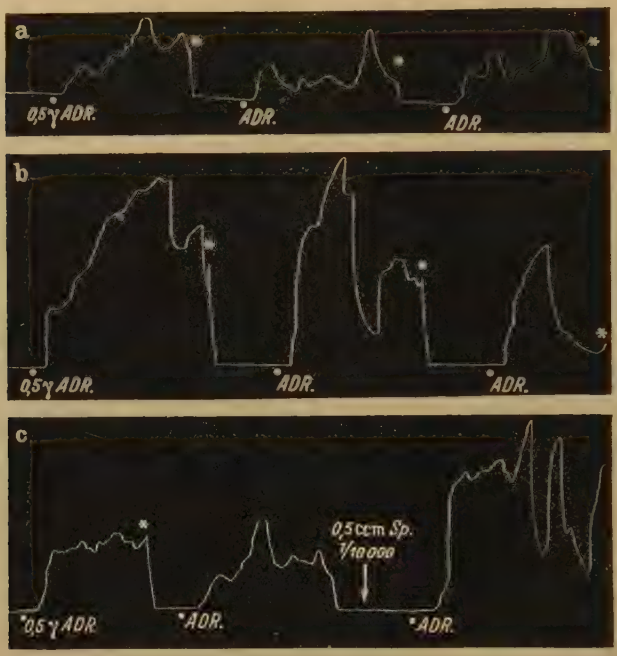


Abb. 2a—c. Der Sensibilisierungseffekt des Sparteins am Uterus ist reversibel und läßt sich wiederholt hervorrufen (isolierter Kaninchenuterus). Zwischen a und b Zusatz von 0,5 cm³ Spartein 1:10000. * Auswaschen.

2. Die Beeinflussung der Darmwirkung des Acetylcholins und Pilokarpins durch Spartein.

Die Beobachtung HAZARDs, daß die Potenzierung der pressorischen Adrenalinwirkung durch Spartein nach *Ausschaltung des Vagus* wesentlich abgeschwächt ist, läßt an die Möglichkeit denken, daß an der Sensibilisierung für *sympathische Förderwirkungen* durch Spartein, wie sie sich z. B. im Blutdruckversuch an den Gefäßen abspielen, eine Ausschaltung oder Abschwächung *parasympathischer Hemmungen* beteiligt ist. Die Wirkung parasympathischer Erregungsmittel hätte dann durch Spartein abgeschwächt oder aufgehoben werden müssen.

Die Abb. 4 zeigt in einem Versuch am isolierten Kaninchendarm, daß Spartein im gleichen Dosierungsbereich, in dem es am *Uterus* die

Adrenalinwirkung verstärkt, am Darm die *Acetylcholinwirkung abschwächt*. Diese Hemmung der Acetylcholinerregung wird schon, wie aus der Abb. 4 beim zweiten Zusatz von Spartein (2) zu ersehen ist,

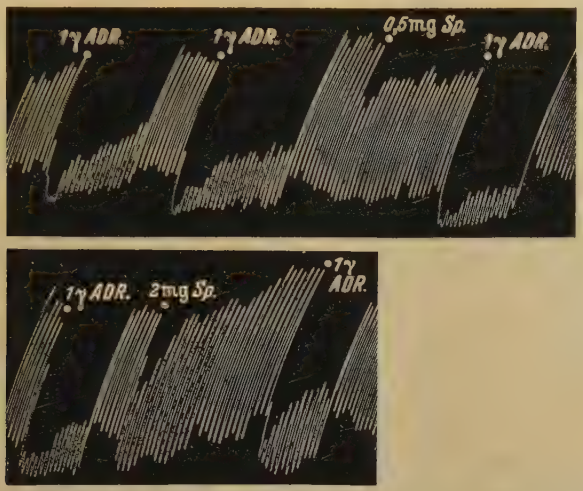


Abb. 3. Die darmlähmende Adrenalinwirkung wird durch Spartein nicht beeinflußt. Isolierter Kaninchendarm in 20 cm³ Tyrode. *ADR.* Adrenalin; *Sp.* Spartein.

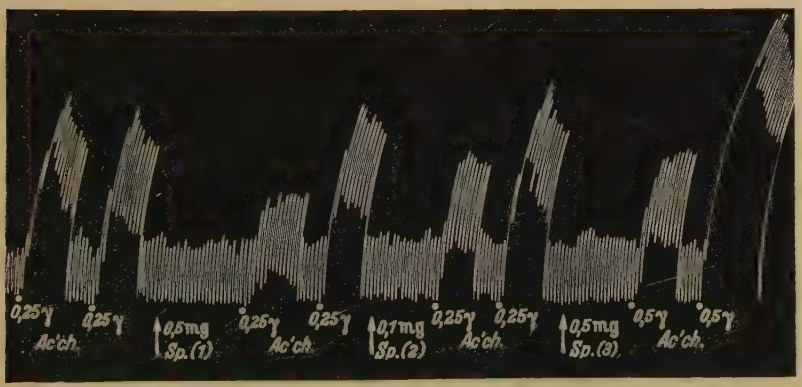


Abb. 4. Hemmung der Acetylcholinwirkung durch Spartein am Kaninchendarm. Die Hemmungswirkung des Sparteins ist leicht auswaschbar. Isolierter Kaninchendünndarm in 20 cm³ Tyrode. *Ac'ch* Acerylcholin; *Sp.* Spartein.

nach der Injektion von nur 0,1 mg Spartein in das 20 cm³ Tyrodelösung enthaltende Versuchsgefäß, also bei einer Konzentration von 1:200000, die nicht die geringste *Eigenwirkung* besitzt, deutlich und hält — beim dritten Sparteinzusatz (3) — auch der doppeltstarken Acetylcholindosis gegenüber stand. Der Hemmungseffekt läßt sich im Gegensatz zur Lähmungswirkung des *Atropins* leicht auswaschen. Nur

einmaliger Tyrodewechsel stellt die normale Ansprechbarkeit für Azetylcholin wieder her.

Die Abb. 5 zeigt das gleiche Verhalten in einem Versuch mit *Pilokarpin*. Die im zweiten Teil dieses Versuches auf der Höhe der

Abb. 5. Hemmung der Pilokarpinwirkung durch Spartein am Kaninchendarm. *Pi.* Pilokarpin; *Sp.* Spartein.

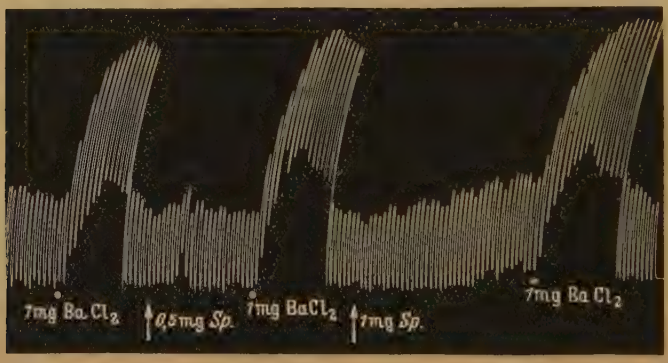


Abb. 6. Die Darmwirkung des Bariums wird durch Spartein nicht beeinflußt. Isolierter Kaninchendarm. *Sp.* Spartein.

Pilokarpinwirkung verabfolgte Sparteingabe (2) verursacht einen deutlichen Tonusabfall des Darmes unter Größerwerden der Pendelbewegungen.

Daß diesem *Hemmungseffekt* des Sparteins auf die Darmwirkung der parasympathischen Erregungsmittel Acetylcholin und Pilokarpin

eine gewisse *Spezifität* zukommt, daß er seinen Angriffspunkt in der *parasympathischen Innervation* des Darmes hat, wird durch das Ergebnis von Versuchen mit dem direkt muskulär angreifenden

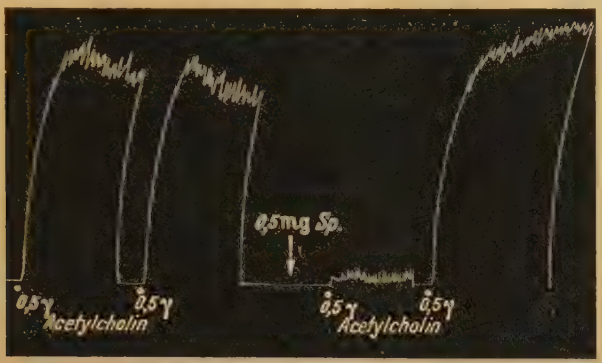


Abb. 7. Hemmung der Acetylcholinwirkung durch Spartein am Meerschweinchendarm. Meerschweinchenjejunum in 20 cm³ Tyrode.

Bariumchlorid wahrscheinlich: die Bariumkontraktion des Darmes bleibt durch Spartein vollkommen unbeeinflußt (Abb. 6).

Versuche am *Meerschweinchendarm* zeigen die parasympathische Hemmungswirkung des Sparteins besonders eindrucksvoll. In dem

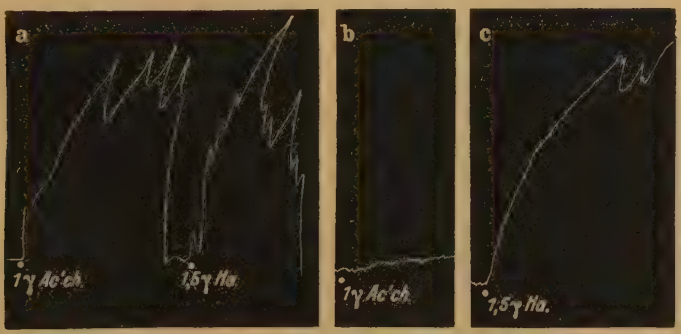


Abb. 8. Die Histaminwirkung am Darm bleibt im Gegensatz zur Acetylcholinwirkung durch Spartein unbeeinflußt. Meerschweinchenjejunum. Zwischen a und b sowie zwischen b und c Zusatz von 0,5 mg Spartein. *Ac'ch* AcetylcholiC; *Ha.* Histamin.

Versuch der Abb. 7 wird die Acetylcholinkontraktion durch Spartein vollständig unterbunden, und im Versuch der Abb. 8 schließlich manifestiert sich noch einmal die *Spezifität* des Hemmungsmechanismus: unter gleichen Versuchsbedingungen, unter denen die *Acetylcholinwirkung* durch Spartein aufgehoben wird, bleibt die *Histaminwirkung* ungeschmälert bestehen.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

Die erhöhte Ansprechbarkeit des *Kaninchenuterus* auf *Adrenalin* nach Vorbehandlung mit an sich uterusunwirksamen Sparteinkonzentrationen zeigt, daß die zuerst am Blutdruck beobachtete adrenalinsensibilisierende Wirkung des Sparteins[4] in der *Peripherie* anzugreifen vermag, und daß sie unter Bedingungen auftritt, die eine irgendwie geartete Mitwirkung der *Nebennieren*, die von anderer Seite[5] in Betracht gezogen wurde, ausschließen. Der *Hemmungseffekt* des Sparteins auf *parasympathische Erregungswirkungen*, der am *Darm* ebenfalls nach Vorbehandlung mit an sich unwirksamen Alkaloidmengen auftritt, könnte für eine Erklärung der adrenalinsensibilisierenden Sparteinwirkung insofern herangezogen werden, als da, wo der *Sympathikus fördert* und der *Parasympathikus hemmt*, der Fortfall parasympathischer Hemmungen eine Verstärkung der Sympathikuswirkung bedeuten würde, eine „Sensibilisierung" für Adrenalin, wie sie z. B. auch nach kleinen Dosen *Atropin* bisweilen beobachtet wird. Dieser Mechanismus käme für die Potenzierung der *Blutdruckwirkung* des Adrenalins *in Frage* und stände hier im Einklang mit der Beobachtung Hazards, daß nach vorheriger Ausschaltung antagonistischer parasympathischer Einflüsse durch Vagusdurchschneidung der Sparteineffekt nicht mehr auftritt; er käme dagegen *nicht* in Frage für die *Sensibilisierung* am *Uterus*, da hier der Sympathikus *nicht* Antagonist des Parasympathikus ist, vielmehr beide gleichsinnig, nämlich erregend wirken. In diesem Falle müßte vielleicht eine *direkte*, wenn auch zunächst nicht näher analysierbare Sensibilisierung der sympathischen Innervation angenommen werden. Für eine Erklärung der nach Spartein verstärkten blutdrucksteigernden Adrenalinwirkung wäre schließlich noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß es unter dem Einfluß des dem *Nikotin* pharmakologisch nahestehenden Alkaloids zu einer *Verlangsamung* des *Blutumlaufs* und dadurch bedingter scheinbarer Sensibilisierung des Gefäßsystems für Adrenalin käme, wie sie für Nikotin *selbst* nachgewiesen ist[7].

Zusammenfassung.

Ausgehend von der Beobachtung französischer Forscher, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des *Adrenalins* durch *Spartein* potenziert wird, und für das Zustandekommen dieses Sparteineffektes die Intaktheit des Vagus von Bedeutung ist, wurden Versuche am *isolierten Uterus* und *Darm* gemacht, um Aufschluß über *Angriffspunkt* und *Mechanismus* der Wirkung zu erhalten. Sie hatten folgende Resultate:

[7] Börner, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **79**, 218 (1916).

1. Die *Erregungswirkung* des *Adrenalins* am *Kaninchenuterus* wird durch Sparteinkonzentrationen, die an sich uterusunwirksam sind, *verstärkt*. Diese sensibilisierende Wirkung ist auswaschbar und läßt sich am gleichen Präparat wiederholt hervorrufen. Die *Lähmungswirkung* des *Adrenalins* am *Kaninchendarm* wird durch Spartein in gleicher Dosierung nicht beeinflußt.

2. Die Erregungswirkung des *Acetylcholins* und *Pilokarpins* am Kaninchen- und Meerschweinchendarm wird durch Sparteinverdünnungen, die an sich darmunwirksam sind, abgeschwächt oder aufgehoben. Die Hemmungswirkung des Sparteins ist leicht auswaschbar. Ihre *Spezifität* kommt darin zum Ausdruck, daß sie sich nicht auf die Darmwirkung des *Histamins* und des *Bariums* erstreckt.

3. Es wird versucht, diese Befunde mit zu verwerten zur Erklärung des Sensibilisierungseffektes, den Spartein auf die *Blutdruckwirkung* des *Adrenalins* ausübt.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

Über die Beeinflussung der Adrenalindiurese durch Ergotoxin und Yohimbin.

Von

Peter Holtz und Karl Credner.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1948.)

Frühere Untersuchungen[1] hatten ergeben, daß die intramuskuläre Injektion größerer Adrenalinmengen — 0,25—0,5 mg/kg — bei *Meerschweinchen* und *Ratten* nach Wasserbelastung eine starke diuretische Wirkung hatte. Diese kam *erstens* in einer beschleunigten Ausscheidung des verabfolgten Wassers zum Ausdruck, so daß die Ausscheidungswerte, welche sich bei den Kontrollen nach 3—4 Stunden fanden, von den „Adrenalintieren" schon nach 1—$1^1/_2$ Stunden erreicht wurden, *zweitens* — besonders deutlich in den Versuchen mit Meerschweinchen — in einer „überschießenden" Harnsekretion, so daß die sezernierten Harnmengen das verabfolgte Wasserquantum um 60—100% überstiegen.

Die erstgenannte Wirkung, diese gleich zu Versuchsbeginn einsetzende Beschleunigung der Sekretion könnte vielleicht mit der *Kreislaufwirkung* des Adrenalins — Erhöhung des allgemeinen Blutdrucks und damit des Filtrationsdrucks im Glomerulussystem — erklärt werden. Demgegenüber war es nicht möglich, die später auftretende „überschießende" Harnsekretion, deren Ursache nur die Mobilisierung größerer Mengen Gewebswassers sein konnte, ebenfalls auf die Gefäßwirkung des Adrenalins zurückzuführen. Für ihr Zustandekommen war vielmehr neben der Kreislaufwirkung und unabhängig von dieser eine direkt im Gewebe angreifende „*Gewebswirkung*" anzunehmen. Die Unabhängigkeit dieses im Gewebe angreifenden Effektes von der Kreislaufwirkung ließ sich in unserer schon erwähnten Arbeit[1] durch Kombinationsversuche mit *Oxytyramin* demonstrieren. Oxytyramin wirkt bei Meerschweinchen blutdrucksenkend und verursacht wohl deshalb im Diureseversuch eine Diuresesperre, die 1—$1^1/_2$ Stunden dauert. Auch bei gleichzeitiger Injektion von Adrenalin treten diese für Oxytyramin charakteristischen

[1] Holtz, P., K. Credner u. F. Heepe: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 85 (1947).

Wirkungen auf, während z. B. die durch *Pituitrin* verursachte Diuresesperre von Adrenalin durchbrochen wird. In Gegenwart von Oxytyramin bleibt der pressorische Adrenalineffekt aus. Trotzdem kommt es im weiteren Verlauf des Versuches, wenn die depressorische, diuresehemmende Oxytyraminwirkung nach 1—2 Stunden abgeklungen ist, zu der die „Gewebswirkung" des Adrenalins kennzeichnenden, auf einer Mobilisierung von Gewebswasser beruhenden „überschießenden" Harnsekretion.

In der vorliegenden Arbeit haben wir im Hinblick auf die mit Oxytyramin durchführbare Differenzierung zwischen Kreislauf- und Gewebswirkung den Einfluß des *Ergotoxins* und des *Yohimbins* auf die Adrenalinindiurese untersucht —, zweier Alkaloide, von denen bekannt ist, daß sie die *eine* Komponente der diuretischen Adrenalinwirkung, die Gefäßwirkung, zu modifizieren vermögen, indem sie den *pressorischen* Adrenalineffekt in einen *depressorischen* umkehren. Es schien uns von Interesse, ob auch die andere, am Zustandekommen der Gesamtwirkung beteiligte und vermutlich besonders wichtige Komponente, die „Gewebswirkung", beeinflußt würde.

Wenn die Wirkung von *Ergotoxin* und *Yohimbin* sich auf die Beeinflussung der *Kreislaufwirkung* des Adrenalins beschränken würde, so daß dann also lediglich eine Umkehr der Blutdruck*steigerung* in eine Blutdruck*senkung* stattfände, so wäre zu erwarten, daß ähnlich wie in unseren früheren Versuchen mit Oxytyramin, in denen die blutdrucksenkende Wirkung des Amins die blutdrucksteigernde Adrenalinwirkung nicht aufkommen ließ, es auch bei der Kombination der beiden Alkaloide mit Adrenalin zu einer langdauernden Diuresesperre käme, an die sich dann nach dem Abklingen der depressorischen Phase, ebenfalls in Analogie zu den Oxytyraminversuchen, eine „überschießende" Harnsekretion als Kennzeichen der unbeeinträchtigten „Gewebswirkung" des Adrenalins anschließen müßte. Würde jedoch auch die „*Gewebswirkung*" des Adrenalins durch Ergotoxin und Yohimbin betroffen, so müßte — anders wie in den Versuchen mit Oxytyramin — die sonst im Anschluß an die Diuresesperre auftretende, das verabfolgte Wasserquantum weit übersteigende „Harnflut" ausbleiben.

Versuche.

Methodik.

Für die Diureseversuche benutzten wir die gleiche Methodik wie in der vorangegangenen Arbeit[1]. *Männliche Meerschweinchen* im Gewicht von 300—500 g erhalten 3 Tage eine Diät von gekochten Kartoffeln, Hafer und Wasser ad libitum. Am Abend des 3. Tages findet eine *Vorwässerung* durch perorale Verabfolgung von 5 cm^3 aqua dest. je 100 g Körpergewicht mit der Schlundsonde statt. Darauf wird den Tieren das Futter entzogen. Am nächsten Morgen erfolgt die *Hauptwässerung* mit 5 cm^3 aqua dest. je 100 g Körpergewicht und intramuskulärer

Injektion der zu prüfenden Substanzen. Die Tiere werden während des Versuches 8 Stunden einzeln in Diuresekäfigen gehalten, die Harnportionen während der ersten 4 Stunden halbstündlich gemessen, dann nur noch einmal nach 8 Stunden abgelesen. Die Ausscheidung betrug in den Leerversuchen mit Vor- und Hauptwässerung, denen jedes Tier unterzogen wurde, bevor es zu den eigentlichen Versuchen benutzt wurde, um untaugliche Tiere ausscheiden zu können[1], im Durchschnitt bei 2 verschiedenen Tierreihen von je 30 Tieren in Prozent der zugeführten Wassermenge:

	1 Stunde		2 Stunden		3 Stunden		4 Stunden		8 Stunden		Zahl der Versuche
I	30%		73%		91%		98%		112%		30
II	19%	± 4,4	61%	± 5	84%	± 6,1	96%	± 5,8	113%	± 7,5	30

Die *Ratten* erhielten vor den Versuchen gewöhnliches Futter, Vor- und Hauptwässerung wie bei den Meerschweinchen; sie befanden sich zu zweit während des Versuches in Diuresekäfigen. Die Ausscheidung im Durchschnitt von 40 Leerversuchen betrug in Prozent des verabfolgten Wassers

1 Stunde		2 Stunden		3 Stunden		4 Stunden		8 Stunden	
27%	± 5,8	65%	± 5,5	69%	± 6,7	75%	± 8	80%	± 7,8

Adrenalin — Yohimbin.

In Übereinstimmung mit unseren früheren Versuchsergebnissen[1] verursacht *Adrenalin* in einer Dosierung von 0,5 mg/kg intramuskulär regelmäßig eine deutliche diuretische Wirkung. Im Versuch der Abb. 1 schied das „Adrenalintier" in 4 Stunden 60% mehr Harn aus als der mit der Schlundsonde verabreichten Wassermenge entsprochen hätte. Die Harnsekretion lag nach 4 Stunden um 60% höher als diejenige des Kontrolltieres (K). Die Injektion von 5 mg/kg *Yohimbin* hat meistens auch eine geringfügige diuretische Wirkung, indem die 4-Stundenwerte nach Yohimbin etwas höher liegen als die Kontrollwerte (Yohimbin). Bei gleichzeitiger Injektion von Hormon und Alkaloid (Adrenalin + Yohimbin) kommt es nun wie bei der Kombination Adrenalin/Oxytyramin unserer früheren Untersuchungen zu einem vollständigen Versiegen der Diurese (Abb. 1). Während die Diuresesperre nach *Oxytyramin* nur bei *Meerschweinchen*, nicht aber bei *Ratten* auftritt, da Oxytyramin, wie wir früher dargelegt haben, nur bei Tierarten mit einem hohen Aminoxydasegehalt der Organe blutdrucksenkend wirkt, kommt es nach Yohimbin/Adrenalin auch im Rattenversuch zu einer Sperre der Harnsekretion, da ja unabhängig von der Tierart und leichter noch bei Fleisch- als bei Pflanzenfressern,

[1] Nähere Angaben in der schon erwähnten Arbeit von HOLTZ, CREDNER und HEEPE.

die pressorische Adrenalinwirkung durch Yohimbin in eine depressorische umgewandelt wird.

Der wesentliche Unterschied in der Beeinflussung der Adrenalindiurese durch *Oxytyramin* einerseits, durch *Yohimbin* andererseits besteht nun darin, das Oxytyramin die „Gewebswirkung" des Adrenalins intakt läßt, so daß sich im Oxytyraminversuch an die Diuresesperre die mehrfach erwähnte „überschießende" Harnsekretion anschließt, während diese im Yohimbinversuch ausbleibt, so daß hier die nach abgeklungener Diuresesperre wieder in Gang kommende Harnausscheidung im 4-Stundenversuch nur Werte erreicht, die denjenigen der Kontrollversuche entsprechen, in denen nur Yohimbin — ohne Adrenalin — injiziert wurde (Abb. 1). Durch Yohimbin wird also nicht nur die *Kreislaufwirkung*, sondern auch die „*Gewebswirkung*" des Adrenalins beeinflußt: die Blutdruckdepression verursacht eine Diuresesperre, die Blockierung der Mobilisierung von Gewebswasser unterbindet die sonst für Adrenalin so charakteristische Ausscheidung großer, die Kontrollwerte weit übersteigender Harnmengen.

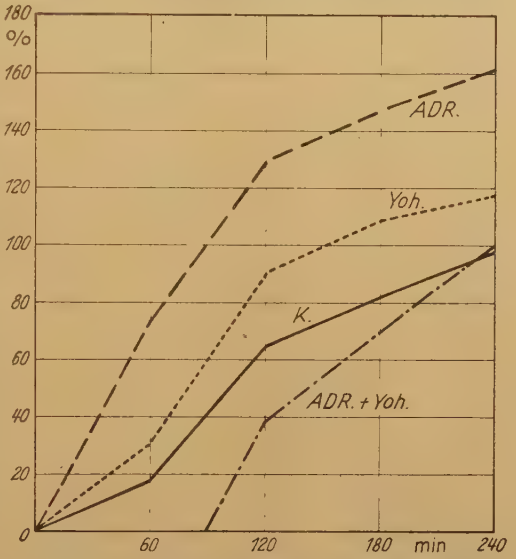


Abb. 1. Adrenalin-Yohimbin. Meerschweinchendiurese (% der verabfolgten Wassermenge). *K* Kontrolle; *ADR.* 500 γ/kg Adrenalin; *Yoh.* 5 mg/kg Yohimbin; *ADR.* + *Yoh.* 500 γ/kg Adrenalin + 5 mg/kg Yohimbin (gleichzeitig injiziert).

Adrenalin — Ergotoxin.

Ähnlich wie nach *Yohimbin* liegen auch nach *Ergotoxin* die Ausscheidungswerte etwas höher als in den Kontrollversuchen mit reiner Wasserbelastung (Abb. 2 und 3). Injiziert man gleichzeitig Adrenalin und Ergotoxin, so bleibt die zu erwartende und in den Yohimbinversuchen regelmäßig auftretende Diuresesperre aus. Ergotoxin unterdrückt bei dieser Versuchsanordnung lediglich die „Gewebswirkung" des Adrenalins, so daß die in 4 Stunden ausgeschiedenen Harnmengen nicht nennenswert größer sind als in den Parallelversuchen, in denen Ergotoxin allein verabfolgt wurde (Abb. 2). Von Blutdruckversuchen an der Katze her wissen wir, daß die Umkehr sympathischer

Erregungswirkungen nach Yohimbin weit *schneller* als nach Ergotoxin erfolgt. Im allgemeinen wirkt Adrenalin schon 10 Min. nach einer *subkutanen Yohimbininjektion* rein depressorisch, während der Eintritt des Umkehreffektes nach *Ergotoxin* 30—45 Min. auf sich warten läßt, was vielleicht durch die langsamere Resorption des ja an sich konstriktorisch wirksamen Sekale-Alkaloids verursacht ist. Wir haben deshalb in anderen Versuchen Ergotoxin 45 Min. vor Adrenalin injiziert, aber auch dann nie eine Diuresesperre beobachtet. Vielmehr wurde in den meisten Fällen die Adrenalinwirkung dann überhaupt nicht beeinflußt (Abb. 2). Es ist bekannt, daß Meerschweinchen ähnlich wie Kaninchen sich der „Umkehrwirkung" des Ergotoxins gegenüber sehr resistent verhalten. Wir gingen deshalb dazu über, auf eine *erste* Ergotoxingabe nach 30—45 Min. eine *zweite* Injektion der gleichen Dosis gleichzeitig mit Adrenalin folgen zu lassen, und erhielten auf diese Weise dann regelmäßig Diuresesperren gleichen Ausmaßes wie in den Versuchen mit *einmaliger* Injektion von Yohimbin. Die Kurven der Abb. 3 erläutern den Verlauf und das Ergebnis eines solchen Versuches.

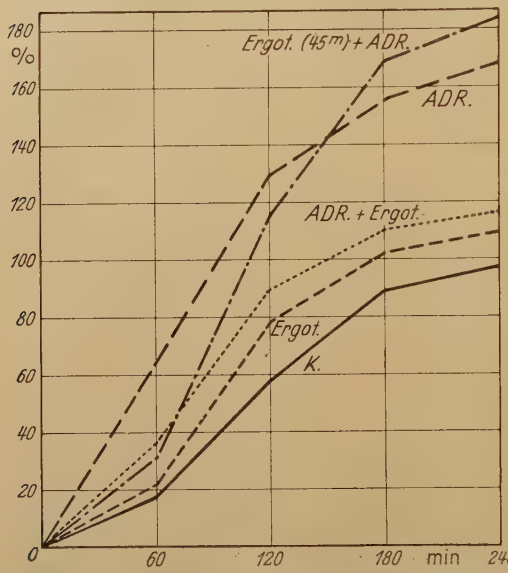


Abb. 2. Adrenalin-Ergotoxin. Meerschweinchendiurese. *K* Kontrolle; *ADR.* 500 γ/kg Adrenalin; *Ergot.* 5 mg/kg Ergotoxin; *ADR.* + *Ergot.* 500 γ/kg Adrenalin + 5 mg/kg Ergotoxin (gleichzeitig); *Ergot.* (*45 m*) + *ADR.* 5 mg/kg Ergotoxin, 45 Min. später 500 γ/kg Adrenalin.

Die gleichzeitige Applikation von *Adrenalin* und *Ergotoxin* hat auffällige „Nebenwirkungen". Schon Ergotoxin allein verursacht 1—1½ Stunden nach der Injektion motorische Unruhe und Nagesucht. Diese zentralen *Erregungssymptome* treten bei der Kombination Adrenalin/Ergotoxin verstärkt auf, wobei es zu einer deutlichen Beschleunigung der Atmung kommt. Aus älteren Untersuchungen von MELLANBY und HUGGETT[2] an Katzen sowie von BOUCKAERT und CZARNECKI[3] an Hunden geht hervor, daß die nach größeren Adrenalindosen auftretende *Apnoe* schon durch an sich unwirksame Mengen Ergotoxin oder Ergotamin in

[2] MELLANBY, J. and. A. HUGGETT: J. Physiol. (Brit.) **57**, 395 (1923). — [3] BOUCKAERT, J. J. et. E. CZARNECKI: J. Physiol. et Path. gén. **25**, 654 (1927). Zit. nach G. BARGER: In HEFFTERS Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg.-Werk, Bd. 6, S. 144. 1936.

ihr Gegenteil umgekehrt wird. Die *Ratten*, die zu zweit in den Diuresekäfigen unter übergestülpten großen Glastrichtern saßen, boten ein eigentümliches Bild. Ungefähr 45—60 Min. nach Versuchsbeginn begann die Innenwand der Trichter zu beschlagen, etwas später kondensierte sich der Wasserdampf in Tröpfchenform, den Ratten klebten die Fellhaare in Streifen am Körper, sie sahen aus, als wären sie gerade aus dem Wasser gezogen worden. Man gewann den Eindruck eines profusen *Schweißausbruches*, der aber bei dieser Tierart wegen des Fehlens von Schweißdrüsen nicht möglich ist. Auch die Kondensation zu tropfbar flüssigem Wasser an den Trichterwänden spricht für eine enorm gesteigerte Feuchtigkeitsabgabe durch die Exspirationsluft, die ihrerseits durch die stark *beschleunigte Atmung* und die zeitweise *gedrosselte Diurese* verursacht sein muß. Wesentlich dabei ist das hohe Wasserangebot der „Hauptwässerung", das die Tiere zu bewältigen hatten, wozu ihnen bei vorübergehend blockierter Ausscheidung durch die Niere und beim Fehlen von Schweißdrüsen nur noch das Abdampfen in der Lunge übrig blieb. Denn diese starke pulmonale Wasserabgabe blieb aus, wenn den Tieren ohne gleichzeitige Wässerung Adrenalin/Ergotoxin injiziert wurde, obwohl auch dann die Atemfrequenz gleichermaßen erhöht war.

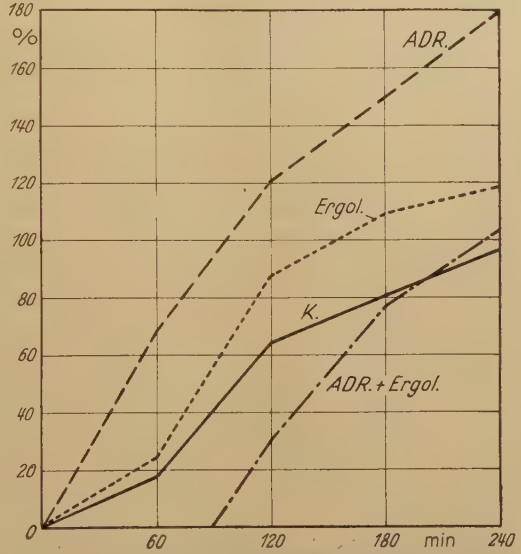


Abb. 3. Adrenalin-Ergotoxin. Meerschweinchendiurese. *K* Kontrolle; *ADR.* 500 γ/kg Adrenalin; *Ergot.* 5 mg/kg Ergotoxin; *ADR.* + *Ergot.* 5 mg/kg Ergotoxin, 45 Min. später 500 γ/kg Adrenalin + 5 mg/kg Ergotoxin.

Arterenol — Yohimbin.

Arterenol, das entmethylierte Adrenalin, ist von gleicher Blutdruckwirksamkeit wie Adrenalin * und beeinflußt, wie wir in der vorangegangenen Arbeit[1] gezeigt haben, in gleicher Weise wie dieses die Diurese. Es *unterscheidet* sich von *Adrenalin* in seinem Verhalten zu *Ergotoxin* und *Yohimbin*, indem seine pressorische Wirkung durch die Alkaloide nicht *umgekehrt*, sondern nur *abgeschwächt* wird. Demnach war zu erwarten, daß im Diureseversuch die kombinierte Injektion von Yohimbin und Arterenol keine Diuresesperre verursache, sondern nur die wassermobilisierende „Gewebswirkung" aufhebe, so daß die Sekretionskurve *Yohimbin-Arterenol* in ihrem Verlauf mit derjenigen des Yohimbin-Kontroll-

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Inzwischen von H. J. Schümann durchgeführte Versuche ergaben, daß dl-Arterenol zwar an der *Katze* mindestens von gleicher Blutdruckwirksamkeit wie l-Adrenalin ist, am *Meerschweinchen* jedoch von einer 4—5fach schwächeren Wirkung.

versuchs praktisch zusammenfallen müßte. Das Ergebnis eines solchen, in der Abb. 4 dargestellten Versuchs entspricht tatsächlich dieser Erwartung und belegt damit gleichzeitig die Richtigkeit der im Vorhergehenden gemachten Annahme, in der bei gleichzeitiger Injektion von Yohimbin zu erwartenden „Umkehr" der Gefäßwirkung des Adrenalins sei die eigentliche *Ursache* für die in diesen Versuchen auftretende Diuresesperre zu erblicken.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

Die *adrenalin-antagonistische* Wirkung des *Ergotoxins* und *Yohimbins* auf die Wasserdiurese, die am *Meerschweinchen* besonders deutlich in Erscheinung tritt, dürfte hauptsächlich da angreifen, wo auch der charakteristische Adrenalineffekt, die „überschießende Harnsekretion", und die ihr zugrunde liegende Wassermobilisierung ihren Angriffspunkt haben: *im Gewebe*. In der älteren Literatur[4] finden sich schon, wenn auch zum Teil widerspruchsvolle Angaben, aus denen zu entnehmen ist, daß diese „Gewebswirkung" des Adrenalins eine vor allem den *Mineralhaushalt* betreffende *Stoffwechselwirkung* ist.

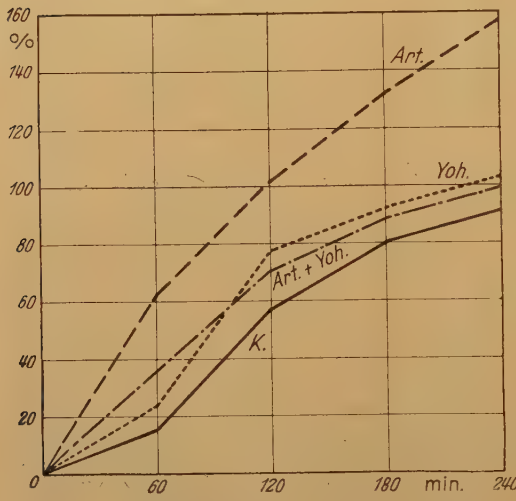


Abb. 4. Arterenol-Yohimbin. Meerschweinchendiurese. *K* Kontrolle; *Art.* 500 γ/kg dl-Arterenol; *Yoh.* 5 mg/kg Yohimbin; *Art.* + *Yoh.* 500 γ/kg Arterenol + 5 mg/kg Yohimbin.

Am längsten bekannt ist der an den *Gefäßen* und an anderen *glattmuskeligen Organen* sich abspielende Adrenalin-Ergotoxin-Antagonismus[5], der hier zur Umkehr *exzitatorischer* Adrenalinwirkungen in *inhibitorische* führen kann, und der in unseren Versuchen wohl durch Umwandlung der blutdruck*steigernden* Wirkung des Adrenalins in eine blutdruck*senkende* zur Ursache für die am Versuchsbeginn auftretende Sekretionssperre wird. RAYMOND-HAMET[6] verdanken wir die Kenntnis, daß *Yohimbin* sich in dieser Hinsicht ähnlich wie die

[4] BIEBERFELD, J.: Pflügers Arch. **119**, 341 (1907). — FREY, W. BULCKE u. P. WELS: Dtsch. Arch. klin. Med. **123**, 163 (1917). — [5] DALE, H. H.: J. Physiol. (Brit.) **34**, 163 (1906); **46**, 291 (1913). — [6] RAYMOND-HAMET: Zit. nach GOTTLIEB-MEYER: Lehrbuch der experimentellen Pharmakologie.

Mutterkornalkaloide verhält. Durch spätere Untersuchungen[7] wissen wir, daß aber auch ganz andersartige Wirkungen des Adrenalins, *Stoffwechselwirkungen* durch Ergotoxin und Ergotamin gehemmt werden, so z. B. die Wirkung auf *Grundumsatz* und *Kohlenhydratstoffwechsel*. Die Beeinflussung seiner diuresefördernden „Gewebswirkung" durch Ergotoxin ordnet sich damit dem auch auf dem Gebiet des Stoffwechsels bestehenden Adrenalin-Ergotoxinantagonismus ein. Auch hier scheint Yohimbin sich wie das Mutterkornalkaloid zu verhalten. In einer besonderen Arbeit soll über den *Mechanismus* der antagonistischen Wirkung von Ergotoxin und Yohimbin auf die Adrenalindiurese berichtet werden.

Zusammenfassung.

I. *Ergotoxin* und *Yohimbin* modifizieren in *zweifacher* Art den diuretischen Adrenalineffekt an Meerschweinchen und Ratten, die zu Beginn des Versuchs mit 5 cm^3/kg Wasser belastet wurden:

1. Die beiden Alkaloide verursachen in Dosierungen, die an sich keinen nennenswerten Einfluß auf den normalen Verlauf der Wasserdiurese ausüben, eine komplette *Sperre* der Harnsekretion von 1 bis $1^1/_2$stündiger Dauer.

2. Nach Lösung der Sperre holt die Diurese auf und erreicht in der gleichen Zeit wie bei den unbehandelten Kontrolltieren die der verabfolgten Wassermenge ungefähr entsprechenden Ausscheidungswerte. Die *„überschießende" Harnsekretion* der „Adrenalintiere", die z. B. bei Meerschweinchen die verabfolgte Wassermenge um 60—80% übersteigt, bleibt bei gleichzeitiger Injektion von Yohimbin oder Ergotoxin aus.

II. Die *Diuresesperre* wird mit der Beeinflussung der *Gefäßwirkung* des Adrenalins durch die Alkaloide erklärt: Umkehr der pressorischen Adrenalinwirkung in eine depressorische. Das *Ausbleiben* der *„überschießenden" Harnsekretion* wird auf eine Hemmung der *„Gewebswirkung"* des Adrenalins, der vermutlich besonders den Mineralhaushalt betreffenden Stoffwechselwirkung durch Ergotoxin und Yohimbin zurückgeführt und anderen bekannten, auf dem Gebiet des Stoffwechsels sich abspielenden Adrenalin-Ergotoxinantagonismen eingeordnet.

[7] Literaturübersicht bei G. Barger: The Alkaloids of Ergot. In Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg.-Werk, Bd. 6, S. 84. 1938.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz).

Über die Beeinflussung der Diurese durch Ephedrin, Sympatol, Veritol und Pervitin.

Von

Karl Credner.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1948.)

Im Rahmen unserer Untersuchungen[1, 2] über die diuretische Wirkung des *Oxytyramins*, *Adrenalins* und anderer Sympathikomimetika habe ich auch die in der Überschrift genannten Stoffe geprüft. Die Versuche wurden wie früher so auch jetzt an *Meerschweinchen* und *Ratten* gemacht. Die angewandte Methodik war die gleiche wie in den beiden vorangegangenen Arbeiten, auf die deshalb verwiesen wird. Zum Verständnis der Versuche und ihrer Darstellung in den Abbildungen sei nur erwähnt, daß die Tiere am Vorabend des Versuchs 5 cm³/100 g Wasser mit der Schlundsonde als „*Vorwässerung*" erhielten, zum eigentlichen Versuch am nächsten Tag dann die gleiche Wassermenge als „*Hauptwässerung*". Gleichzeitig wurden die zu prüfenden Substanzen, in 0,5—1,0 cm³ NaCl 0,9% gelöst, intramuskulär injiziert. Die sezernierten Harnmengen werden in Prozent des verabfolgten Wassers angegeben.

1. Ephetonin und Sympatol.

Meerschweinchen. Ephetonin wirkt am Meerschweinchen diuresefördernd. Dosen unter 25 mg/kg sind im allgemeinen unwirksam. Als sicher wirksame Gabe erwiesen sich 50 mg/kg, deren diuretischer Effekt meistens schon nach 60 Min. die Normalwerte um mehr als das Doppelte übertraf (Abb. 1). Nach 90 Min. hatte die Harnausscheidung bereits die Menge des peroral zugeführten Wassers überschritten, und im weiteren Verlauf des Versuches kam es zu einem Überschießen der Diurese über die verabfolgte Wassermenge hinaus, so daß die ausgeschiedenen Harnmengen am Ende des 4-Stundenversuchs immer deutlich höher als beim Kontrolltier lagen, wenn sie auch niemals die hohen Werte unserer Adrenalinversuche ganz erreichten. Es ist bemerkenswert, daß auch die sehr große Dosis von 100 mg/kg Ephetonin keine *Hemmung*, sondern eine *Förderung* der Diurese verursachte.

[1] Holtz, P., K. Credner u. F. Heepe: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 85 (1947). — [2] Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 180 (1949).

Sympatol zeigte ein unerwartetes Verhalten: in den Dosierungen, in denen Ephetonin deutliche diuretische Wirkungen ausübte, war Sympatol praktisch wirkungslos (Abb. 1).

Ratten. In unseren früheren Versuchen hatten sich die beiden benutzten Tierarten — *Meerschweinchen* und *Ratte* — allen untersuchten Substanzen gegenüber gleichsinnig verhalten, wenn sie auch *quantitative* Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit zeigten. Die einzige

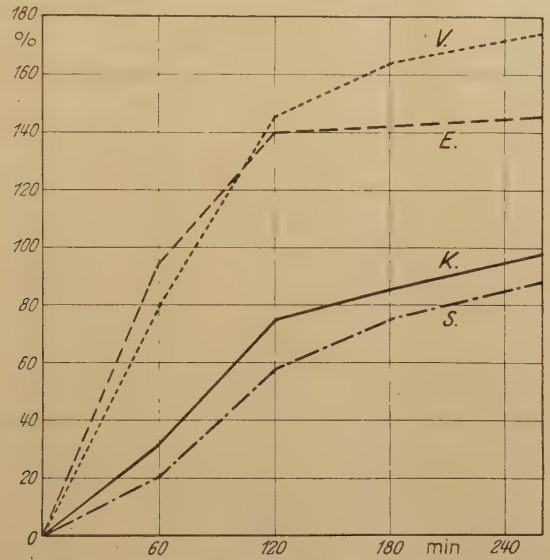


Abb. 1. Meerschweinchendiurese. Ephetonin-Sympatol-Veritol. *K* Kontrolle; *E* 50 mg/kg Ephetonin; *S* 50 mg/kg Sympatol; *V* 25 mg/kg Veritol.

Ausnahme war *Oxytyramin*, das wegen seiner andersartigen Kreislaufwirkung beim Meerschweinchen nicht *fördernd* wie bei der Ratte, sondern *hemmend* auf die Diurese wirkte. Es war deshalb überraschend, daß Ephedrin und Sympatol in den Versuchen mit Ratten gerade umgekehrt wirkten wie in den Meerschweinchenversuchen: an der *Ratte* ist das bei Meerschweinchen stark wirksame *Ephetonin* praktisch ohne Wirkung, während das am *Meerschweinchen* wirkungslose *Sympatol* bei *Ratten* in Dosierungen von 50—100 mg/kg eindeutig fördernd auf die Harnausscheidung wirkt (Abb. 2).

2. Pervitin und Veritol.

Pervitin wurde nur an *Ratten* untersucht. Dosierungen von 5 mg/kg besaßen keine nennenswerte Wirkung auf die Diurese, dagegen verursachten 10 mg/kg und ausgeprägter noch 20 mg/kg eine deutliche Beeinträchtigung, die zwar nicht in einer totalen Harnsperre, aber

doch in einer über die ganze Versuchsdauer sich erstreckenden Hemmung der Harnabsonderung zum Ausdruck kam (Abb. 2). Es ließ sich keine Pervitindosis ausfindig machen, die *diuresefördernd* gewirkt hätte.

Veritol führte in geeigneter Dosierung bei beiden Tierarten zu einer Förderung der Wasserdiurese. Beim Meerschweinchen erwies es sich in Dosen von 25—100 mg/kg als eines der diuretisch-wirksamsten Sympathikomimetika überhaupt, indem es an die Wirksamkeit des

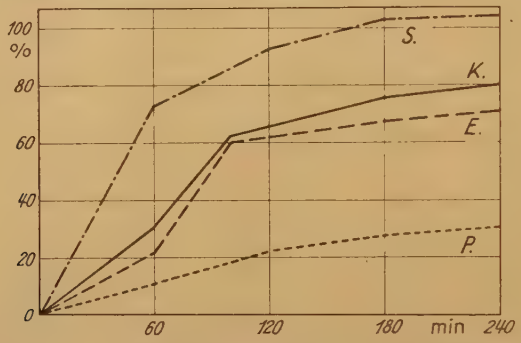


Abb. 2. Rattendiurese. Ephetonin-Sympatol-Pervitin. *K* Kontrolle; *E* 50 mg/kg Ephetonin; *S* 50 mg/kg Sympatol; *P* 20 mg/kg Pervitin.

Adrenalins heranreichte (Abb. 1). Während auch die hohe Dosierung von 100 mg/kg am *Meerschweinchen* einen reinen *Fördereffekt* hatte, verursachte sie an der *Ratte* eine *Hemmung* der Diurese.

Zusammenfassung.

1. In Versuchen an *Meerschweinchen* wirkt *Ephedrin* in Dosierungen von 25—100 mg/kg diuresefördernd; *Sympatol* ist in gleicher Dosierung wirkungslos.

In Versuchen an *Ratten* verhalten die beiden Substanzen sich gerade umgekehrt.

2. *Veritol* erwies sich am Meerschweinchen als besonders stark diuretisch wirksam. Höhere Dosierungen, die bei Meerschweinchen reine Förderwirkung besaßen, bewirkten bei Ratten eine Hemmung der Harnausscheidung.

Pervitin, das nur an Ratten untersucht wurde, übte in allen Dosierungen eine reine Hemmungswirkung auf die Diurese aus.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg.

Über den Bildungsort des uteruswirksamen Prinzips und seine Formalinstabilität*.

Von

Bernhard Hölscher.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. April 1948.)

Einleitung.

Nach einer Mitteilung von Trendelenburg und Sato tritt nach Hypophysenentfernung bei Hunden das uteruswirksame Prinzip des Hypophysenhinterlappens vermehrt im Tuber cinereum auf. Über den Bildungsort der Hypophysenhinterlappen-Wirkstoffe bestehen nach wie vor noch starke Meinungsverschiedenheiten. Die Erforschung der hormonalen Tätigkeit des Hinterlappens ist besonders mit Schwierigkeiten verbunden, weil die Exstirpationsversuche zu keinem Ziele führen. Die Gesamtentfernung des Hinterlappens verursacht gar keine Erscheinungen. Wenn Störungen auftreten, so sind diese auf Verletzungen der Nachbarschaft zurückzuführen. Auch Transplantationsversuche waren ergebnislos. Die räumliche Beziehung des Hypophysenhinterlappens zu den lebenswichtigen Teilen des Hypothalamus stört die Sicherheit der Ergebnisse, da eine akute massive Schädigung dieser Region nicht überstanden wird.

Nach Abel kommen als Orte der Bildung der Hypophysenhinterlappen-Wirkstoffe außer der Pars intermedia und dem Hypophysenhinterlappen noch Teile der Hirnbasis, nämlich der bereits genannte Hypothalamus in Betracht. Diese Ansicht wird damit begründet, daß nach Ausschaltung der Hypophyse hier spezifische Substanzen in vermehrtem Maße auftreten. Der morphologische Beweis fehlt jedoch. Collin hat in verschiedenen Arbeiten die Theorie von der *Neurokrinie* entwickelt und zu stützen versucht. Er beschrieb die Bildung eines Kolloids aus hyperzyanophilen Zellen des Hypophysenvorder- und -zwischenlappens. Dieses nimmt seinen Weg zum Hinterlappen. Der Autor unterscheidet im Hinterlappen zwischen perivaskulärem und interstitiellem Kolloid. Ein Teil desselben gelangt nach ihm entlang den Nervenfasern bis zu den Kernen des Hypothalamus, wo es sich noch in unmittelbarer Nachbarschaft der Nervenzellen nachweisen läßt. Diese Bildung des Kolloids im Drüsenteil der Hypophyse, seine Ausscheidung in das Nervengewebe des Hirnteils, und die von hier aus stattfindende Diffusion zu den Zentren des Hypothalamus, kurz die *Neurokrinie* genannt, wird durch Arbeiten von Scharrer, Gaupp und Peters angezweifelt.

* Für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sind wir der Firma C. F. Böhringer und Söhne, Mannheim-Waldhof, zu größtem Dank verpflichtet. Die Versuchstiere wurden in dankenswerter Weise von der Firma Knoll AG. Ludwigshafen und dem Hygienischen Institut Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Sie sind der Auffassung, daß das Kolloid, das in und zwischen den Ganglienzellen der vegetativen Kerne des Zwischenhirns bei Mensch und Tier nachzuweisen ist, an Ort und Stelle durch sekretorische Tätigkeit der betreffenden Ganglienzellen entsteht, und sprechen von einer sog. „Zwischenhirndrüse". Um Verwechslungen zu vermeiden, schlägt COLLIN vor, die eventuelle Sekretion der Ganglienzellen als *Neurikrinie* zu bezeichnen.

Morphologische Untersuchungen an menschlichen Neurohypophysen, die HÖLSCHER und HOLZER mit Hilfe der Silbermanganmethode durchführten, ergaben, daß der Hypophysenhinterlappen, der Hypophysenstiel und das Infundibulum, die zusammen als Neurohypophyse bezeichnet werden, ein Gliasynzytium aufweisen, das sich von dem Gliasynzytium des Zentralnervensystems unterscheidet. Die Grundstruktur der Neurohypophyse ist ein Synzytium, das Homologe von Makrogliaelementen enthält und das feine Wabenwerk vermissen läßt, welches anfänglich HELD für die Randpartien und später HOLZER für die in der Tiefe gelegenen Teile des Zentralnervensystems nachwiesen. Im gesamten Hinterlappen der Hypophyse konnten jedoch Ganglienzellen nicht gefunden werden. An der Grenze von Infundibulum und Tuber cinereum ließ sich mikroskopisch ein kontinuierlicher Übergang des weitmaschigen Gliasynzytiums des Infundibulums in das engmaschige des Zentralnervensystems mit seinem feinen Wabenwerk erkennen. An der gleichen Stelle wurden vereinzelt Nervenzellen nachgewiesen. In der gesamten Neurohypophyse kommen besonders reichlich Nervenfasern vor. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß die Neurohypophyse schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium ihren eigenen Weg nimmt, um sich für ihre spätere spezifische Funktion zu differenzieren.

Auf Grund dieser morphologischen Verschiedenheit des Gliasynzytiums der Neurohypophyse und des Zentralnervensystems nimmt HÖLSCHER an, daß es sich in der Neurohypophyse um ein endokrines Organ handelt mit einem spezifisch gebauten Zellsubstrat, welches einzig und allein zur Produktion der Hinterlappenwirkstoffe befähigt ist. Die Übernahme der Hypophysenhinterlappen-Sekretion durch Hypothalamusgewebe muß vor allem deshalb abgelehnt werden, weil 1. die Neurohypophyse und der angrenzende Hypothalamus sich im Bau ihres Gliasynzytiums unterscheiden und 2. in der Neurohypophyse im Gegensatz zum Hypothalamus keine Ganglienzellen vorkommen.

Da infolge des kontinuierlichen Überganges der Neurohypophyse in das Kerngebiet des Tuber cinereum eine Ausschaltung der Neurohypophyse ohne Verletzung des benachbarten Hypothalamus experimentell überhaupt nicht denkbar ist — weil letztere den Tod des Tieres zur Folge haben würde —, kann der Beweis für die endokrine Natur der Neurohypophyse nur durch Extrakte erbracht werden.

Wenn Trendelenburg und Sato ein vermehrtes Vorkommen von Hypophysenhinterlappen-Wirkstoffen im Tuber cinereum hypophysektomierter Hunde beobachtet haben, so liegt das nach der eben dargelegten Auffassung daran, daß durch diesen Eingriff das Neurohypophysengewebe nicht total entfernt und der verbliebene Rest der Neurohypophyse vermehrt zur Hormonbildung angeregt wurde. Diese Autoren sahen in den ersten Tagen nach der Operation in der Mehrzahl der Fälle eine temporäre oder dauernde Polyurie, deren Grad Hölscher abhängig macht von der Menge des nicht exstirpierten, funktionstüchtigen Neurohypophysengewebes, wie er auf Grund von Erfahrungen an hypophysektomierten Ratten schließt.

Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, durch Extrakte verschiedener Gewebsabschnitte des Zentralnervensystems nach den bekannten Extraktionsmethoden für den Hypophysenhinterlappen Beweise für die spezifische Funktion des Gliasynzytiums der Neurohypophyse zu erbringen, die durch den verschiedenen Bau des Gliasynzytiums der Neurohypophyse und des Zentralnervensystems nahegelegt wird. Wir haben in dieser Arbeit das uteruswirksame Prinzip des Hypophysenhinterlappens als Standard für unsere Untersuchungen gewählt und vergleichend damit Auszüge aus den verschiedensten Anteilen des Zentralnervensystems einschließlich der Neurohypophyse und eines gliösen Tumors, der unter Zerstörung des Hypothalamus keine Wasserhaushaltsstörungen verursacht hatte, untersucht.

Material und Methodik.

Unsere Apparatur war nach dem Prinzip der für die Standardisierung von Hypophysenextrakten von Magnus-Kehrer angegebenen Methode aufgebaut. Die Nährflüssigkeit bestand aus Lockelösung in der von Sawasaki angegebenen Zusammensetzung: NaCl 9,0, KCl 0,42, $CaCl_2$ 0,24, $NaHCO_3$ 0,5, $MgCl_2$ 0,005, Glukose 0,5, Aqua dest. ad 1000,0. Insgesamt wurden Uteri und Darmstücke von 29 Meerschweinchen im Gewicht von 150—250 g verwendet.

Das Ausgangsmaterial für unsere Versuchssubstanzen bildeten Gehirne und Hypophysen von Rindern, in Formalin gelegte menschliche Hypophysenhinterlappen sowie die Substanz eines gliösen Tumors im Bereich des Hirnanhangs, der ebenfalls in Formalin fixiert war.

Die Gehirne und Hypophysen der Rinder wurden unmittelbar nach der Schlachtung in noch warmem Zustand vom Bindegewebe freipräpariert. Die Hypophysen wurden in 3 verschiedene Partien geteilt, wobei vom Vorderlappen und Hinterlappen jeweils nur die Kuppe abgetrennt wurde, um so möglichst einwandfrei ihre Trennung zu erreichen. Das restliche Mittelstück mit Stiel und Infundibulum wurde für sich extrahiert. Ein Teil der Hypophysen wurde in toto weiter verarbeitet. Aus Großhirn und Kleinhirn wurden einzelne Gewebsstücke herausgeschnitten, das Infundibulum einige Millimeter vom Ansatz am Hypothalamus entfernt abgetrennt und der Zwischenhirnboden mit Einschluß der Corpora mamillaria aus dem Zusammenhang mit den angrenzenden Hirnteilen gelöst. Die auf diese Weise gewonnenen Gewebsabschnitte des Gehirns und der Hypophysen wurden sofort nach der Entnahme in frischem Zustand, wie folgt, weiterverarbeitet: Ein Teil Substanz wird mit 5 Gewichtsteilen Wasser 4 Stunden lang geschüttelt. Dann wird zentrifugiert. Der Zentrifugenrückstand wird nochmals mit 5 Gewichtsteilen Wasser 2 Stunden lang geschüttelt und dann zentrifugiert.

Die vereinigten Filtrate bildeten die Fraktion B. Die mit Wasser extrahierten Hypophysen werden in 2 Partien aufgearbeitet. Die eine Partie wird zweimal mit 5 Teilen Wasser vom p_H 3,8 (Essigsäure) für 2 Stunden geschüttelt, die vereinigten Filtrate werden im Vakuum bei 45° C eingeengt und mit 5 Volumina 95%igem Alkohol verrührt. Die sich hierbei bildende Fällung wird mit Alkohol und Äther getrocknet. Der trockene Rückstand wird mit 10 Vol. Eisessig gut verrührt und zentrifugiert. Das klare Filtrat wird mit 3 Vol. trockenem Äther verrührt und 12 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Die Fällung wird mit Äther getrocknet. Das mit saurem Wasser extrahierte Präparat bildet die Fraktion D. Der andere Teil der mit Wasser extrahierten Hypophysen wird mit 5 Gewichtsteilen Wasser vom p_H 9,2 (Natronlauge) zweimal je 2 Stunden geschüttelt. Der alkalische Extrakt wird auf p_H 4,5 gebracht und im Vakuum bei 45° C eingeengt. Die eingeengte Lösung wird mit 5 Vol. Alkohol verrührt. Die Fällung wird, wie bei Fraktion D angegeben, verarbeitet. Der alkalische Extrakt trägt die Bezeichnung A.

Formalinfixierte menschliche Hypophysenhinterlappen wurden nach Trocknung in einem Mörser fein zu einem staubartigen Pulver verrieben. Ebenso wurde ein Stück des erwähnten Tumors behandelt, das der Gegend, in der vermutlich ursprünglich die Hypophyse lokalisiert gewesen ist, entnommen worden war.

Die Dosierung bewegte sich zwischen Gaben von 0,02—2,0 mg unbekannter Substanz (ähnliche Dosen werden von PENAU, TRENDELENBURG und GUGGISBERG angegeben). Sofern eine Substanz uteruskontrahierende Wirkung hatte, wurde Antergan (im allgemeinen 0,1 mg) der Nährlösung zugefügt, um eine Histaminwirkung auszuschließen. Da die Erschlaffung des Uterus nach einer durch eine Vergiftung hervorgerufenen Kontraktion relativ sehr langsam vor sich geht, war diese Methode der Histaminausschaltung nicht augenfällig und überzeugend. Es wurden daher sämtliche Substanzen am Meerschweinchendarm nachgeprüft, an dem der Histamin-Anterganantagonismus geradezu eklatant ist. Um etwaige Salze als kontraktionsauslösende Elemente auszuschließen, wurden die wirksamen Substanzen noch verascht und in den ursprünglichen Mengen entsprechenden Dosen erneut am Uterus geprüft. Für die Prüfung der Apparatur auf ihre Brauchbarkeit wurden für den Uterus der Hypophysintest, für den Darm der Histamintest bestimmt. Das Hypophysin war an gut ansprechbarem Uteri noch mit 1/200 *VE* auf 50 cm³ Lockelösung — das entspricht einer Verdünnung von 1:10000 — wirksam. Der Histamintest wurde auf 0,1 mg, d. h. 1:500000, festgelegt. Von vornherein war darauf verzichtet worden, den Gehalt eventuell wirksamer Substanzen quantitativ im Vergleich zu den Standardpräparaten genau zu eruieren.

Versuchsergebnisse.

Während im Großhirn, Kleinhirn, Zwischenhirn, Rückenmark und im Hypophysenvorderlappen das oxytoxische Prinzip nicht nachgewiesen werden konnte, erzeugten die wäßrigen und sauren Extrakte der Gesamthypophyse, des Hinterlappens und die Tumorsubstanz in Dosen von 0,02 mg bis 1 mg konstant am Uterus Tonussteigerungen mit nachfolgenden Kontrakturen, am Darm Tonuserhöhungen, die mit dem Histamininhibitor Antergan nicht ausgeschaltet werden konnten. Nach der Veraschung dieser wirksamen Substanzen konnte jedoch kein Effekt mehr erzielt werden. Extrakte aus dem Stiel und Infundibulum hatten nur eine schwache Wirkung. Auffällig war dagegen außer der starken Wirksamkeit der Tumorsubstanz, daß

Abb. 1.

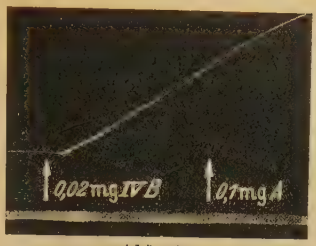


Abb. 2.

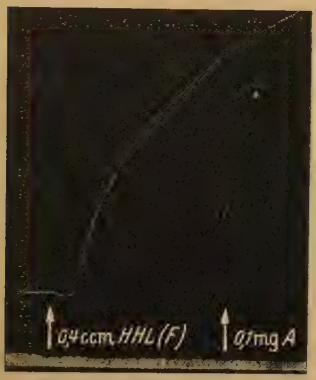


Abb. 3.

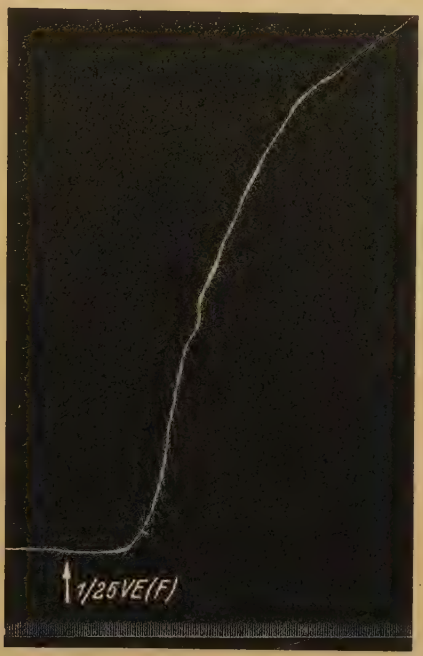


Abb. 4.

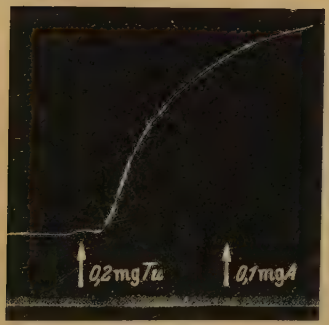


Abb. 5.

Abb. 6.

Abb. 1. Meerschweinchenuterus, *VE* = Hypophysin in VOEGTLIN-Einheiten.

Abb. 2. Meerschweinchenuterus, *IV B* = Hypophysenhinterlappen, wäßrig extrahiert. *A* = Antergan.

Abb. 3. Meerschweinchenuterus, *HHL (F)* = Hypophysenhinterlappen in Formalin, *A* = Antergan.

Abb. 4. Meerschweinchenuterus, *VE (F)* = Hypophysin in VOEGTLIN-Einheiten nach Einwirkung von 5 %igem Formalin.

Abb. 5. Meerschweinchenuterus, *Tu* = Hypophysentumor.

Abb. 6. Meerschweinchenuterus, *III D* = Zwischenhirn, sauer extrahiert.

Versuche mit durch Formalin konservierten Hypophysenhinterlappen einerseits und Mischungen aus Hypophysinstandardlösung mit 5%igem Formalin keine Einschränkung der Uteruswirksamkeit zeigten. Diese Befunde wurden von anderer Seite bestätigt (Höchster Farbwerke).

Im vorstehenden geben wir zur Erläuterung der Befunde einige Kurvenbeispiele (Abb. 1—6).

Zusammenfassung.

1. Entsprechend dem verschiedenartigen Bau des Gliasynzytiums der Neurohypophyse von dem des Zentralnervensystems wurde eine nur der Neurohypophyse zukommende Bildung von Hinterlappenwirkstoffen angenommen.

2. Das uteruswirksame Prinzip konnte nur in Extrakten aus Neurohypophysengewebe, sowie in einer Aufschwemmung von formalinkonservierten Hypophysenhinterlappen und einem wahrscheinlich von der Neurohypophyse ausgehenden Tumor gefunden werden.

Literatur.

Abel, J. J.: Bull Hopkins Hosp., Baltim. **35**, 305 (1924). — Abel and Nagayama: J. Pharmacol. (Am.) **15**, 347 (1920). — Abel and Rouiller: J. Pharmacol. (Am.) **20**, 65 (1922). — Abel, Rouiller and Geiling: J. Pharmacol. (Am.) **22**, 289 (1923). — Collin, R.: C. r. Soc. Biol. **87**, 549, 1206 (1922); **88**, 92 (1923). — Ann. Méd. **18**, 428 (1925). — Rev. franç. Endocrin. **4**, 241 (1926). — La neurocrinie hypophysaire. Monographie. Paris 1928. — Riv. Neur. **2**, 555 (1929). — Dale, H. H. and H. W. Dudley: J. Pharmacol. (Am.) **18**, 27 (1921). — van Dyke: Arch. exper. Path. (D.) **114**, 262 (1926). — de Eds, Floyd, Rosenthal and Voegtlin: J. Pharmacol. (Am.) **33**, 269 (1928). — Gaupp, R.: Z. Neur. **171**, 514 (1941). — Gaupp, R. jun.: Fschr. Neur. **13**, 257 (1941). — Z. Neur. **177**, 50 (1944). — Gaupp, R. u. E. Scharrer: Z. Neur. **153**, 326 (1935). — Guggisberg, H.: Arch. Gynäk. **144**, 185 (1930). — Z. Geburtsh. **75**, 231 (1941). — Hanke and Koessler: J. biol. chem. (Am.) **43**, 557, 567 (1920). — Held: Über den Bau der Neuroglia und über die Wand der Lymphgefäße in Haut und Schleimhaut. Monographie. Leipzig 1903. — Holzer, W.: Z. Neur. **97**; **173**. — Holzer, W. u. B. Hölscher: Arch. Psychiatr. (D.) **1948**. — Jores, A. u. E. Zschimmer: Arch. exper. Path. (D.) **174**, 715 (1934). — Kamm, Aldrich, Grote, Rowe and Bugbee: J. amer. chem. Soc. **50**, 573 (1928). — Kamm, Grote and Rowe: J. biol. Chem. (Am.) **92**, 69. — Kimmig, J.: Dtsch. med. Wschr. **1947**, Nr 41/42, 598. — Klaften: Z. Geburtsh. **112**, 318 (1936). — Köhler: Mschr. Geburtsh. **52**, 240 (1920). — Penau et Simmonet: Ann. Physiol. (Fr.) **4**, 683 (1928). — Runge: Helvet. med. Acta **7**, 51 (1940). — Sato, G.: Arch. exper. Path. (D.) **131**, 45 (1928). — Sawasaki, H.: Pflügers Arch. **209**, 137 (1925). — Scharrer, E.: Z. Neur. **145**, 462; **155**, 743. — Scharrer, E. u. R. Gaupp: Z. Neur. **140**, 766 (1933); **148**, 766. — Klin. Wschr. **1935**, 1651. — Simon u. Nagy: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 243 (1934). — Smith and McClosky: J. Pharmacol. (Am.) **24**, 391 (1924). — Temesvary: Z. Geburtsh. **1926**, 322. — Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. (D.) **138**, 301 (1928). — Die Hormone, Bd. 1. Berlin 1929. — Trendelenburg, P. u. Borgmann: Biochem. Z. **106**, 329 (1920). — Trendelenburg, P. u. G. Sato: Arch. exper. Path. (D.) **128**, 114 (1928).

Aus dem Strahleninstitut des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G., Forschungsanstalt Insel Riems bei Greifswald (Prof. Dr. H. Ruska).

Dissoziationstheorie der osmotischen Hämolyse.

Über die osmotische Hämolyse als Strukturproblem.

Von

B. Lindemann.

Mit 16 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. April 1948.)

Einleitung.

Verschiedenartige schädigende Einflüsse erzeugen an Erythrozyten in vitro eine Hämolyse, d. h. einen Hämoglobinverlust der roten Blutzelle. Die Wirkung von Wasser und hypotonischen Salzlösungen, eine sog. osmotische Hämolyse, ist im Reagenzglasversuch leicht nachzuweisen. Sinkt der osmotische Druck in der Außenlösung gegenüber dem Zellinnendruck, schwellen die Erythrozyten durch Wasseraufnahme an; wird dabei das „kritische Volumen" überschritten, kommt es zu ihrer Auflösung. Im allgemeinen verläuft die Reaktion bei entsprechenden Diffusionsbedingungen nach dem Alles- oder Nichtsgesetz, d. h. jeder einzelne Erythrozyt hämolysiert vollständig oder bleibt intakt. In konzentrierten Erythrozytensuspensionen mit kleinen Außenvolumina beobachtet man jedoch die Erscheinung der partiellen Hämolyse, von der wir hier bei der Beschreibung der Morphologie der osmotischen Hämolyse ausgehen wollen, ohne zunächst weiter auf die quantitative Analyse einzugehen.

I. Zur Morphologie der osmotischen Hämolyse.

Unter dem Lichtmikroskop läßt sich bei geeigneten Bedingungen deutlich demonstrieren, wie die Erythrozyten im hypotonischen Milieu zunächst Kugelgestalt annehmen. Je länger einzelne Erythrozyten ihre ursprüngliche Scheibenform bewahren, um so resistenter sind sie gegenüber hypotonischen Einflüssen. Nach einer gewissen Latenzzeit verblassen dann die Kugelformen innerhalb weniger Sekunden (2—6 Sekunden). Zurück bleibt nur ein blasser, morphologisch nicht mehr zu differenzierender Schatten, der im Hellfeld als blasse Scheibe im Dunkelfeld deutlich als heller Ring sichtbar ist und im allgemeinen als Erythrozytenstroma bezeichnet wird. Im Dunkelfeldpräparat bemerkt man vor der eintretenden Hämolyse in lebhafter Bewegung leuchtende Körnchen im Erythrozyten, die von Bechhold als Lipoidentmischung im Zellinhalt gedeutet wurden. Bei beginnender Hämolyse löst sich im Erythrozyten vom Rande ein leuchtender

Ring, zieht sich zusammen und bildet schließlich ein zentrales leuchtendes Körperchen. Bald ist auch dieses verschwunden und zurück bleibt der grauweiße Außenring mit dunkler Innenfläche, das Erythrozytenstroma, in dem sich vereinzelt noch einige rotleuchtende Körnchen nachweisen lassen.

Eine über die geschilderten Befunde hinausgehende morphologische Analyse der Feinstruktur hämolysierender Erythrozyten ist mit den Methoden der Lichtmikroskopie nicht möglich. Die vielfach versuchten Ansätze, morphologische Einzelheiten lichtmikroskopisch zu deuten, führten zu widerspruchsvollen Hypothesen. Durch das begrenzte Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops blieb ein direkter Einblick in diese feindimensionierte Strukturwelt verwehrt. Einen wesentlichen Fortschritt auf dem Wege zur Klärung der Erythrozytenstruktur brachten erst die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Ruska, Wolpers, Jung u. a. Den alten Streit über die Bauweise des Erythrozyten, ob Bläschenstruktur oder Schwammgefüge, haben diese Untersuchungen zugunsten der ältesten anatomischen Vorstellung entschieden, nach welcher der Erythrozyt als ein mit Hämoglobin gefüllter Ballon zu betrachten ist. Dadurch wurde die in der Permeabilitätstheorie angenommene semipermeable Membran oder Grenzschicht als anatomische Membran eindeutig nachgewiesen.

Auf Grund des elektronenmikroskopischen Studiums verschiedener Stadien hämolysierender Erythrozyten sei im folgenden eine Morphologie der osmotischen Hämolyse beschrieben, die für die Theorie des Hämolysevorganges von Bedeutung ist.

Methodik.

Die Besonderheiten des Elektronenmikroskops und die von der Lichtmikroskopie abweichende Untersuchungs- und Präparationstechnik sind in den Arbeiten von B. v. Borries, E. Ruska, H. Ruska, C. Wolpers, F. Jung u. a. eingehend beschrieben, auf die verwiesen sein soll.

Bei den hier zu schildernden Versuchen wurde ausschließlich mit dem stets frisch entnommenen Blut eines 31jährigen gesunden Mannes experimentiert, teils mit Zitratblut (1 Teil Natrium citricum — 4 Teile Blut), teils ohne gerinnungshemmende Zusätze gearbeitet. Das Zitrat scheint eine vermehrte Stechapfelbildung der Erythrozyten zu verursachen.

Für die morphologische Untersuchung der osmotischen Hämolyse war es notwendig, Übergänge von nicht hämolysierten zu völlig hämolysierten Erythrozyten festzuhalten. Sehr gut lassen sich die verschiedenen Grade der Hämolyse aus einer Verdünnungsreihe gewinnen, die aus 1 Teil Blut und 1 Teil Wasser, 1 Teil Blut und 2 Teilen Wasser usw. bis 1 Teil Blut und 500 Teilen Wasser besteht. Als Suspensionsmedium kann Plasma, Serum verwandt werden, oder man wäscht Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung oder isotonischer Tyrodelösung und geht von einer Kochsalz- oder Tyrodesuspension aus, die ebenfalls nach der vorstehenden Verdünnungsreihe angesetzt werden. Je nach der Ausgangssuspension erhält man die Plasma-, Serum-, Kochsalz- oder Tyrodesuspensionsreihe. Aus allen genannten Verdünnungsreihen lassen sich gut partiell hämolysierte Erythrozyten darstellen. Welche Bedeutung jedoch die Ausgangssuspension für die zu beobachtenden Strukturveränderungen im Erythrozyteninnern hat, darauf wird später eingegangen. Nach 1stündiger Hämolyse wurden die Suspensionen zentrifugiert (3 Min. bei 3000 Touren) und die Bodensätze mit 1% OsO_4 fixiert. Nach abgeschlossener Fixation (15 Min. bis 24 Stunden, der Zeitfaktor kann vernachlässigt werden, da Unterschiede an den einzelnen verschieden lange fixierten Erythrozyten nicht nachzuweisen waren) wurden dann die fixierten

Erythrozyten zur Entfernung der strukturmaskierenden Bluteiweißkörper 3mal mit Aqua dest. gewaschen, im Wassertropfen auf Zaponlackfilme aufgetrocknet und elektronenmikroskopisch untersucht. Um nach Möglichkeit Fixationsmittelwirkungen auszuschließen und solche spezifischen Fixationsmittelwirkungen beurteilen zu können, wurden Kontrolluntersuchungen mit verschiedenen gebräuchlichen Fixationsmitteln (1% OsO_4, Formalinlösung, 1 Teil Formol 38% und 3 Teile Aqua dest., dann reines 38%iges Formol, Zenkerlösung modifiziert nach Maximow) vorgenommen. Auch unfixierte Präparate wurden zum Vergleich elektronenmikroskopisch untersucht. Das Formalin in der üblichen in der Histologie angewandten Konzentration (4—10%) eignet sich nicht als Fixationsmittel für Erythrozyten, da es fixiert und gleichzeitig hämolysiert. Für die Darstellung von Erythrozytenmembranen ist es aber als Fixationsmittel brauchbar. Die Zenkersche Lösung verursacht zum Teil bizarre Gestaltveränderungen der Erythrozyten und wurde daher nicht weiter herangezogen. Reines 38%iges Formol erzeugt eine Plasmolyse. Die Osmiumfixation hat sich am besten bewährt. Nach den für die Lichtmikroskopie üblichen Verfahren hergestellte lichtmikroskopische Kontrolluntersuchungen wurden ebenfalls durchgeführt und den elektronenmikroskopischen Befunden gegenübergestellt.

Ergebnisse.

Der Ablauf der osmotischen Hämolyse läßt sich an einem und demselben Eyrthrozyten elektronenmikroskopisch nicht beobachten, er muß aus den morphologischen Übergängen verschieden stark hämolysierter Zellen rekonstruiert werden. Aus dem Nebeneinander der Präparate verschiedener Grade osmotischer Hämolyse muß das zeitliche Nacheinander abgelesen werden. Bevor jedoch mit der Beschreibung der morphologischen Besonderheiten hämolysierender Erythrozyten begonnen werden soll, muß eine kurze grundsätzliche Bemerkung über 2 zu beobachtende Typen partiell hämolysierter Erythrozyten vorangestellt werden. Es lassen sich nämlich 2 Formen partiell hämolysierter Zellen beobachten, „Kugelformen", bei denen das Zentrum dunkel und der aufgelockerte Rand hell erscheint, und „Scheibenformen", bei denen das Zentrum hell und der Rand dunkel ist (nach der Auftrocknung der Erythrozyten auf den Objektträger sind die Zellen stets abgeflacht, die „Kugeln" zeigen jedoch die größte durchstrahlbare Dicke zentral, die „Scheibenformen" peripher, entsprechend der Bisquitform des Querschnitts).

Partiell hämolysierte Kugelformen gewinnt man nach 1stündiger Hämolyse aus den Sedimenten der eingangs genannten Verdünnungsreihen, wenn das Sediment nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit sofort fixiert wird. Die so gewonnenen teilhämolysierten Kugelformenerythrozyten haben ein dunkles Zentrum und der Rand ist je nach Hämolysegrad mehr oder weniger aufgehellt. Werden jedoch die gleichen Bodensätze nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit für einige Minuten in isotonischer phosphatgepufferter Tyrodelösung (p_H 7), physiologischer Kochsalzlösung oder Serum suspendiert und

dann erst fixiert, erhält man verschieden stark hämolysierte bikonkave Scheibenformen, bei denen das Zentrum je nach Hämoglobinverlust hell erscheint und der Rand dunkel. In phosphatgepufferter Tyrodelösung tritt der Gestaltwandel der Erythrozyten von der Kugel in die bikonkave Scheibe nahezu regelmäßig an jedem Erythrozyt auf, während in physiologischer Kochsalzlösung einige Kugelformen zurückbleiben, die nicht zur Scheibe überwechseln. Wahrscheinlich ist neben der Isotonie des Suspensionsmediums gleichfalls die Wasserstoffionenkonzentration bestimmend, daß eine Reversion zur physiologischen Gestaltform auftritt.

Die unfixierten partiell hämolysierten Erythrozyten nehmen zumeist neben bizarren Gestaltveränderungen, die als Auftrocknungserscheinung zu erklären sind, bikonkave Scheibenformen an (Abb. 7). Wahrscheinlich sind es die bei der Auftrocknung durch Wasserverlust und Anstieg des Salzgehaltes vorübergehend entstehenden gleichen Bedingungen wie in isotonischen Salzlösungen, die die Erythrozyten eranlassen, die Scheibenformen anzunehmen. Der hämolysierende Erythrozyt verliert neben dem Hämoglobin auch Eigensalze. Je konzentrierter eine Suspension an Erythrozyten ist, um so größer wird durch den Salzverlust der hämolysierten Zellen der osmotische Druck im Außenmedium. Bei der Auftrocknung auf den Zaponlackfilm steigt der osmotische Druck im Suspensionsmedium durch die Wasserverdurstung und erreicht oder überschreitet wahrscheinlich die Höhe, die notwendig ist, damit der Erythrozyt die Scheibenform annehmen kann. Diese notwendige Höhe des osmotischen Druckes muß einer 0,9%igen NaCl-Lösung äquivalent sein. Die partiell hämolysierten unfixierten Erythrozyten ergeben daher die gleichen Bilder bikonkaven Scheibenformen wie die nach der Hämolyse in isotonischen Salzlösungen suspendierten und dann fixierten Erythrozyten.

Noch eine weitere Beobachtung gewinnt grundsätzliche Bedeutung und spricht dafür, daß die entstehenden Strukturveränderungen durch das Suspensionsmedium wesentlich beeinflußt werden. Im allgemeinen zeigen die in Serum fixierten partiell hämolysierten Erythrozyten im Innern eine gleichmäßige körnige Zeichnung, während die aus isotonischer Tyrodelösung und physiologischer Kochsalzlösung isolierten eine grobfleckige Innenstruktur aufweisen (Abb. 5 und 6). Daraus geht hervor, daß die beobachteten Strukturen eine Abhängigkeit von dem Salzgemisch im Suspensionsmedium zeigen. Auch lassen partiell hämolysierte Erythrozyten, die erst nach 8—10 Stunden aus ihrem Suspensionsmedium fixiert werden, eine zunehmend körnige Strukturierung des Inhaltes erkennen. Welche Bedeutung alle diese Beobachtungen für die Erklärung des osmotischen Hämolysevorganges haben, insbesondere für die uns interessierende Zustandsänderung

der Hämoglobinmoleküle selbst, darauf soll in der nachfolgenden Mitteilung eingegangen werden.

Wenden wir uns nun zu der Beschreibung hämolysierender Erythrozyten. Der normale, reife, im peripheren Blut kreisende kernlose Erythrozyt erscheint auf dem Leuchtschirm im Elektronenmikroskop als schwarze Scheibe, oft mit geringer zentraler Aufhellung (Abb. 1). In der Kugelform ist er nicht mehr durchstrahlbar und kommt als durchgehend tiefschwarze Scheibe zur Abbildung. In der durchstrahlbaren Scheibenform lassen sich feinere Strukturen, die für ein

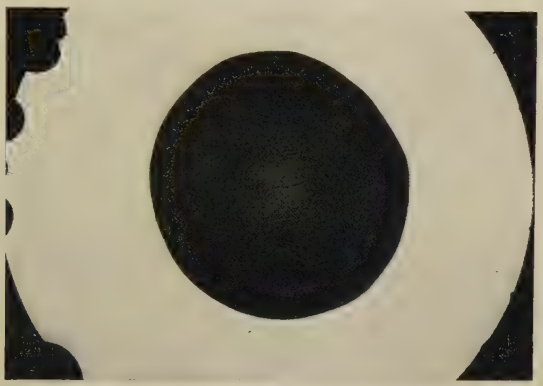


Abb. 1. Erythrozyt in Scheibenform. Osmiumfixation. El. opt. 8300:1.

wandversteifendes Innengerüst im Sinne Rolletts sprechen würden, nicht nachweisen. Größe und Form der einzelnen Erythrozyten variiert entsprechend der von der Lichtmikroskopie her bekannten Schwankungsbreite. Zusätzlich können weitere Veränderungen durch intensive Elektronenstrahlenschädigung auftreten, die gleichfalls berücksichtigt werden müssen. Vor allem verkleinert sich der Erythrozyt durch Schrumpfung im Vakuum. Die Abb. 2 stellt eine beginnende Hämolyse an einem Sphärozyten dar. Das Zentrum ist homogen schwarz, die Randpartie eigentümlich körnig aufgelockert, zur Mitte zunehmend dichter werdend. Zuweilen ist der aufgelockerte Rand gröber gekörnelt oder sogar zusammenfließend grobkörnig. An den stärker hämolysierten Erythrozyten wird das dunkle Zentrum kleiner, die helle körnige Randpartie breiter und aufgelockerter. Nimmt der Hämoglobinverlust des Erythrozyten zu, so findet man auch in der Zellmitte nur noch grobfleckige, zusammengeballte Reste des Zellinhaltes, die fortschreitend ihren Zusammenhang verlieren und, wie zuerst bei der beginnenden Hämolyse in der Randpartie, jetzt auch im Zentrum körnig aufgelockert erscheinen. Zuweilen liegen noch in den Falten der Membran einzelne zusammenhängende Reste des

Zellinhaltes, in anderen Falten sind nur noch aneinanderliegende dunkle Kugeln oder Körner zu sehen. Schreitet die Hämolyse weiter fort, so werden auch diese letzten Reste des Zellinnern spärlicher. Am Ende bleibt nur noch eine meist gefaltete Membran, die bei OsO_4-Fixation

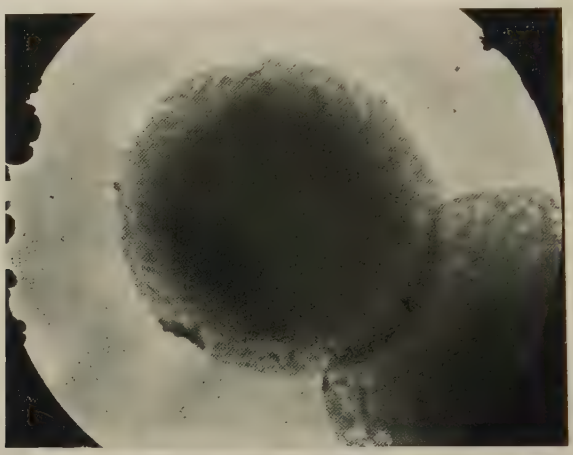


Abb. 2. Beginnende Hämolyse eines Sphärozyten. Osmiumfixation. El. opt. 9000:1.

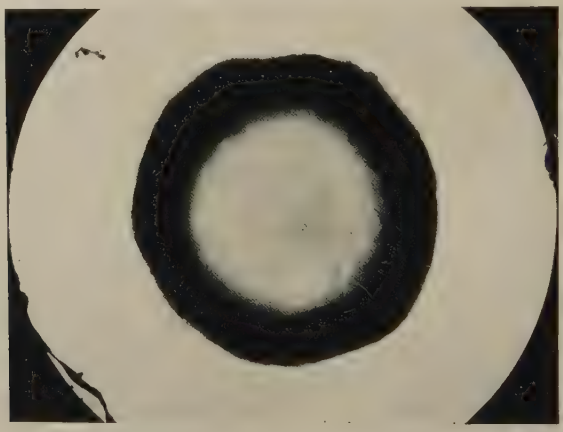


Abb. 3. Partiell hämolysierter Erythrozyt in bikonkaver Scheibenform. Osmiumfixation. El. opt. 9500:1.

mitunter eine punktförmige Zeichnung trägt (Retikulozyten?) und in der letzte Zellreste verstreut verbleiben, zum Teil wohl nicht mehr diffusibler Art.

Die nach der 1stündigen Hämolyse in isotonischer Tyrodelösung (Phosphatpuffer p_H 7), physiologischer Kochsalzlösung oder Serum nachgewaschenen und dann erst fixierten Erythrozyten nehmen wieder ihre physiologische bikonkave Scheibenform an (Abb. 3). Hier wird bei den

teilhämolysierten Erythrozyten die zentrale Aufhellung größer und bei fortschreitendem Hämoglobinverlust der dunkle homogene Randsaum zunehmend schmaler. Das helle durchstrahlbare Zentrum ist in einigen Erythrozyten manchmal etwas kleinfleckig getrübt, der Außenrand

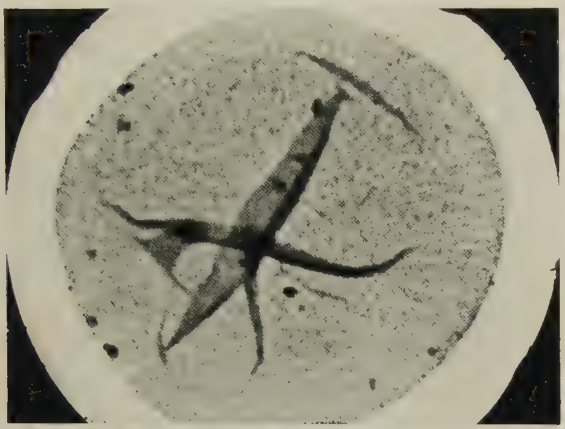


Abb. 4. Hämolyserest. Erythrozytenmembran. Osmiumfixation. El. opt. 9200:1.

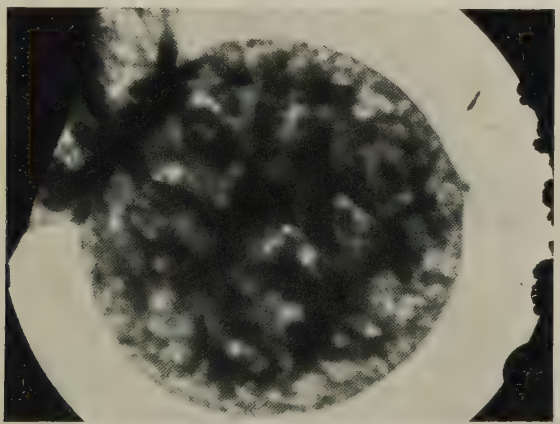


Abb. 5. Hämolysierender Sphärozyt. NaCl-Verdünnungsreihe. Osmiumfixation. El. opt. 8400:1.

des Erythrozyten etwas gezähnelt. In den Falten der Membran, die oft über die zentrale Aufhellung reichen, sammeln sich wie in den von den Kugelformen her bekannten Bildern die Reste des Zellinhaltes an. Sehr häufig kann man an den Membranfalten lange, schmale Fortsätze beobachten, die durch die zurückgebliebenen Reste des Zellinhaltes dunkel erscheinen. In den letzten Stadien der Hämolyse wird schließlich auch der schmale, dunkle homogene Saum am Rande aufgelockert und trägt die schon in den Kugelformen beschriebene

körnige Strukturzeichnung, die dort bei beginnender Hämolyse an dem Rande der Kugelformen auftrat. Den Abschluß der Hämolyse bildet wieder die nahezu inhaltlose gefaltete Membran (Abb. 4).

Den als Regelbefund beschriebenen Bildern sind noch einige nicht ganz selten vorkommende atypische Formen anzuschließen. Vor allem

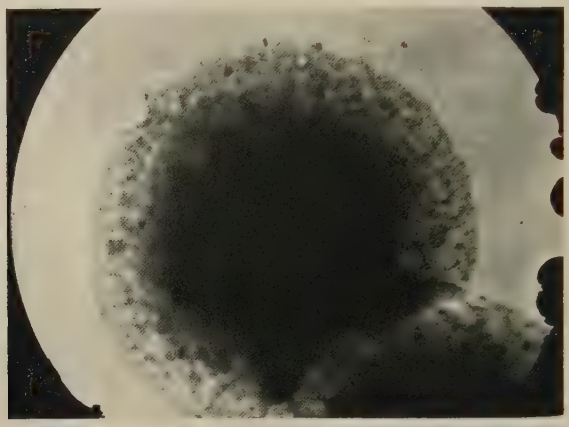


Abb. 6. Hämolysierender Sphärozyt. Serumverdünnungsreihe. Osmiumfixation El. opt. 9000:1.

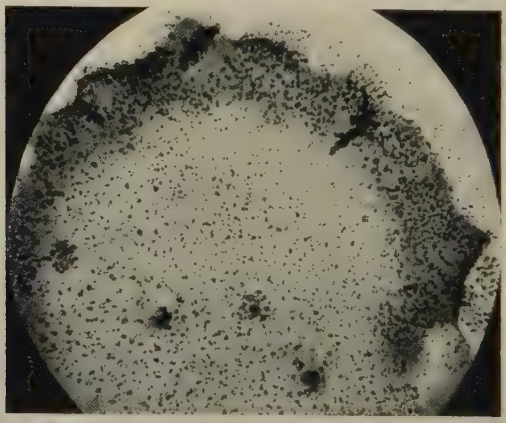


Abb. 7. Partiell hämolysierter Erythrozyt, unfixiert. Präparat und Aufnahme C. Wolpers. El. opt. 1:8000.

werden viele Stechapfelformen beobachtet, die dann auftreten, wenn partiell hämolysierte Erythrozyten mit isotonischen Lösungen nachgewaschen werden. Von diesen Stechapfelformen lassen sich 2 Typen unterscheiden, Stechäpfel mit langen, schmalen und solche mit kurzen, breiten Fortsätzen (Abb. 8, 9). Die Fortsätze sind zum Teil mit Hämoglobinresten ausgefüllt und erscheinen dunkel, oder sie tragen die körnige, aufgelockerte Zeichnung. Vereinzelt werden auch hämolysierte

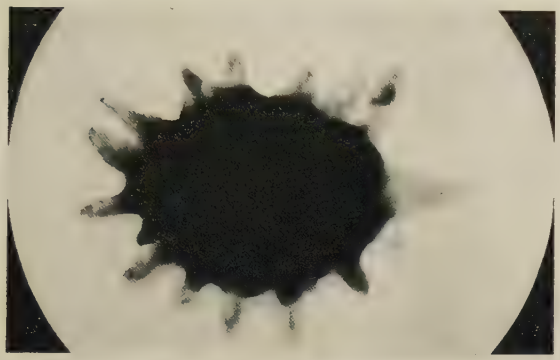


Abb. 8. Partiell hämolysierter Erythrozyt, in Stechapfelform. Osmiumfixation. El. opt. 1:9000.

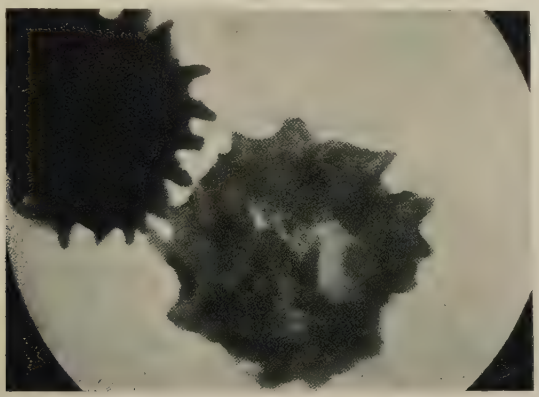


Abb. 9. Partiell hämolysierter Erythrozyt in Stechapfelform. ZENKER-MAXIMOW-Fixation. El. opt. 1:8500.

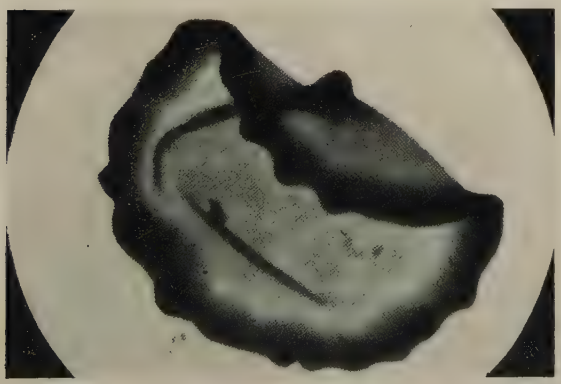


Abb. 10. Partiell hämolysierter Erythrozyt mit beginnender Glockenbildung. Osmiumfixation. El. opt. 1:9200.

Glockenformen in verschiedenen Übergängen beobachtet (Abb. 10). Hin und wieder treten sog. Schießscheibenformen auf, mit dunklem Zentrum, hellerem Saum und abschließendem dunklen Rand (Abb. 11). Einzelne Erythrozyten sind sowohl am Rande als auch im Zentrum körnig aufgelockert, andere lassen nur wahllos verstreut einige grobe Flecke im Innern erkennen. Neben den regelmäßig auftretenden Kugelformen und Scheibenformen, die zu Beginn beschrieben wurden, finden sich die verschiedensten Übergänge und Formen. Sie kennzeichnen alle die Erythrozytenpopulation als „heterovitables System von unterschiedlicher individueller Reaktionsweise".

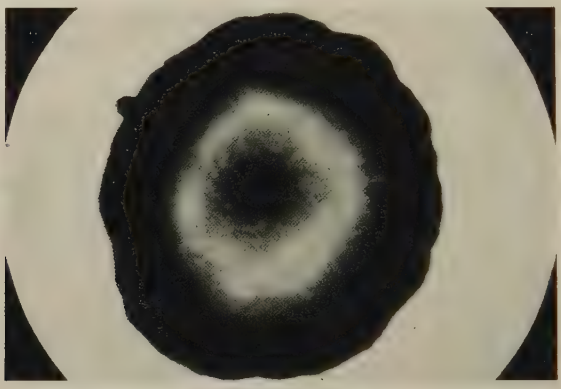


Abb. 11. Partiell hämolysierter Erythrozyt in Schießscheibenform. Osmiumfixation. El. opt. 1:8400.

Besprechung.

Nachdem die Erythrozyten Kugelformen angenommen und die bekannte Phase der durch Wasseraufnahme bedingten osmotischen Schwellung durchlaufen haben, verlieren sie beim hämolytischen Volumen ihr Hämoglobin. Die Membran erfährt durch den Gestaltwandel des Erythrozyten von der Scheiben- zur Kugelform trotz der durch Wasseraufnahme hervorgerufenen Volumenzunahme eine nur kaum meßbare Dehnung. Rißbildungen in der Membran werden nur in den seltensten Fällen beobachtet und können offensichtlich als Artefakte angesprochen werden. Nur am kugelförmigen Erythrozyten ist die Membran für das Hämoglobin durchlässig. Zuerst diffundiert durch die mechanisch intakte Membran das randständige Hämoglobin. Dadurch entsteht nach der Zelloberfläche ein Konzentrationsgefälle. Dann wird das Hämoglobin schrittweise nach innen zunehmend gelockert und diffusibel und permeiert durch die Membran in die Außenlösung. So entsteht die Kugelformenreihe. Endzustand ist der Hämolyserest, die Membran, in der in der Regel noch letzte Reste des Zellinhaltes verbleiben. Partiell hämolysierte Kugelformen lassen eine

deutliche Abhängigkeit ihrer Strukturierung vom Suspensionsmedium erkennen. Die Art der Körnelung des vorwiegend aus Hämoglobin bestehenden Zellinhaltes, ob grob oder fein gekörnelt, hängt vom Salzgemisch im Suspensionsmedium ab. Im Serum fixierte partiell hämolysierte Erythrozyten sind gleichmäßig fein gekörnelt, aus physiologischer Kochsalz- oder Tyrodelösung gewonnene Zellen weisen eine grobfleckige unregelmäßig gezeichnete Innenstruktur auf. Die körnige Strukturierung der aufgehellten Zentralzone von partiell hämolysierten Scheibenformen nimmt zu, wenn die Zellen nach mehreren Stunden in ihrem Suspensionsmedium fixiert werden. Diese morphologischen Befunde sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, daß hier Veränderungen des Dissoziationsgrades der Hämoglobinmoleküle auftreten, die im Erythrozyteninnern wahrscheinlich polymolekulare Assoziationskomplexe bilden, deren Stabilität von der Konzentration der in Lösung gehaltenen Salze weitgehend abhängt (vgl. folgende Mitteilung).

Hämolysierte Kugelformen nehmen in isotonischem Milieu wieder ihre bikonkave physiologische Scheibenform an und erscheinen je nach Hämoglobinverlust als mehr oder weniger hämoglobinarme Normozyten. Der reversible Gestaltwandel der Erythrozyten von der Scheiben- in die Kugelform kann, wie es bereits von lichtmikroskopischen Untersuchungen her bekannt ist, unter den verschiedensten Bedingungen beobachtet werden und wird wahrscheinlich durch einen Spannungswechsel der Membran hervorgerufen, die auf bestimmte Reize mit einer eigentümlichen Zustandsänderung reagiert.

Der Vorgang des Gestaltwandels ist bedingt reversibel. Je öfter die Erythrozyten die Gestalt von der Scheiben- in die Kugelform wechseln, um so mehr Stechapfelformen erscheinen im Blickfeld. Auch der Zellinhalt nimmt mehr und mehr eine körnige Struktur an. Diese Befunde deuten darauf hin, daß irreversible Veränderungen in dem Zustand der Eiweißmoleküle aufgetreten sind.

Neben diesen als Regelbefunden anzusehenden Kugel- und Scheibenformen kommen in einem mikroskopischen Blickfeld zahlreiche Gestaltvariationen vor, die sich aber zumeist von den beiden beschriebenen Haupttypen als Übergangsformen ableiten lassen und durch ihre Vielgestaltigkeit ein für die Erythrozytenpopulation so kennzeichnendes Bild abgeben.

II. Die Dissoziationstheorie der osmotischen Hämolyse.

1. Die Deutung der osmotischen Hämolyse stieß trotz der zahlreichen darauf gerichteten Untersuchungen auf Schwierigkeiten. In hohem Maße waren diese eine Folge der sich widersprechenden Auffassungen über den Feinbau der roten Blutzelle, der bisher nicht so eindeutig

geklärt werden konnte, daß eine allgemein übereinstimmende Vorstellung von der Bauweise des Erythrozyten zustande gekommen wäre. Für die Rückführung biologischer Vorgänge auf bekannte physiologisch-chemische Gesetze ist aber die sichere Kenntnis des morphologischen Gefüges, an dem sich diese Vorgänge abspielen, eine notwendige Voraussetzung. In der vorangehenden Mitteilung wurde die Morphologie der osmotischen Hämolyse beschrieben. Die elektronenmikroskopischen Befunde an hämolysierenden Erythrozyten erlauben in Verbindung mit Ergebnissen der modernen Eiweißchemie eine neue Hypothese zur Deutung der osmotischen Hämolyse, die Dissoziationstheorie[1], aufzustellen, die in der vorliegenden Mitteilung entwickelt wird.

2. Nach der klassischen Theorie mit ihren Variationen (Hamburger, Koeppe, Warburg, Winge, Ege, Jacobs u. a.) wird eine Bläschenstruktur des Erythrozyten mit semipermeabler Membran oder Grenzschicht vorausgesetzt, welche durch die osmotische Schwellung der Blutzelle beim Überschreiten des kritischen Volumens entweder einreißt oder soweit gedehnt wird, daß das Hämoglobin in die Außenlösung diffundieren kann. Die Mehrzahl der Anhänger der klassischen Theorie erklärt die Hämolyse als Diffusionsvorgang durch die gedehnten Poren der Membran oder Grenzschicht.

Ein Einreißen der Membran mit Ausströmen des Hämoglobins an einer Rißstelle ist nur einmal von Comandon und de Fonbrune beobachtet und beschrieben worden. Elektronenoptisch findet man Erythrozytenmembranen mit Rißstellen außerordentlich selten als zufälligen Artefakt. In der Regel ist die Erythrozytenmembran nach osmotischer Hämolyse mechanisch intakt und läßt elektronenmikroskopisch keine groben Löcher erkennen.

In hypotonischen Systemen gehen die Erythrozyten aus ihrer physiologischerweise vorherrschenden Scheibenform gesetzmäßig in eine Kugel- oder Sphärozytenform über. Bei dem Wechsel der Scheibenform zur Kugelform verkleinert sich zunächst bei gleichbleibendem Volumen des Erythrozyten die Oberfläche (Schönheyde, Ponder, Castle, Lepeschkin). Durch die fortschreitende osmotische Schwellung bis zum sog. hämolytischen Volumen (33% Volumenzunahme) nimmt die Oberfläche an Ausdehnung bis zur ursprünglichen Größe in der Scheibenform wieder zu. Ponder kommt zu dem Schluß, daß man im Finalstadium vor der eintretenden Hämolyse höchstens eine nicht meßbare geringe Dehnung der Membran annehmen kann.

Davson und Ponder, die die Erythrozytenmembran als Schichtbau aus Lipoiden und Eiweißteilen betrachten, entwickelten daher eine Theorie, in der Riß und Dehnung der Membran nebeneinander als ursächliche Faktoren des Hämoglobinaustritts angesehen werden. Sie führten den Vorgang der Hämolyse auf 2 parallel laufende Mechanismen zurück: 1. auf eine *Ruptur* der oberflächlichen Lipoidhülle, welche die Membran kationenpermeabel macht, und 2. auf eine *Dehnung* des Proteinmaschenwerks, durch die eine Permeation des Hämoglobins erfolgt. Es wird also angenommen, daß eine äußerst geringe Dehnung der Membran genügt, um mechanisch den Hämoglobinaustritt zu ermöglichen.

[1] Dissoziation bedeutet hier nicht elektrolytische Dissoziation, sondern den Zerfall von großen Molekülen bzw. M-Komplexen, wie es in der Chemie der hochpolymeren Verbindungen üblich ist (s. z. B. Mayer-Mark und Svedberg).

Bechhold entwickelte von Modellversuchen an Lipoiden ausgehend eine Theorie, nach der die Membranstruktur, welche als ein Netz aus Proteiden mit einem Verputz aus Lezithin und Cholesterin angenommen wird, eine Entmischung erfährt. Er führte die Hämolyse nicht auf eine mechanische Läsion, sondern auf eine kolloid-chemische Alteration, auf die *Entmischung* der drei Membranbestandteile Lezithin, Cholesterin und Eiweiß zurück.

Im Gegensatz zur klassischen Theorie, die die osmotische Hämolyse als Diffusionsvorgang durch die alterierte Membran auffaßt, führt Lepeschkin die Hämolyse auf eine mechanische Veränderung der Innensubstanz des Erythrozyten, also auf eine Art Nekrobiose im Zellinnern, zurück. Durch das eintretende Wasser sollen die Vitaide, d. h. die molekularen Bindungsgerüste des Hämoglobins mit den Lipoiden zerstört werden. Das vorher in der Blutzelle gebundene Hämoglobin wird dadurch freigesetzt und diffusibel. Die ultramikroskopischen Beobachtungen Bechhoi ds werden von Lepeschkin als Beweis einer vorangehenden Lipophanerose im Erythrozyten angesehen, d. h. als ein Zeichen dafür, daß unsichtbar fein molekular verteilte Lipoide bei der Hämolyse zu ultramikroskopisch sichtbar werdenden Tröpfchen zusammenfließen (Lipoidentmischung). Lichtmikroskopische Untersuchungen an Froscherythrozyten und mikrurgische Untersuchungsergebnisse von Seifritz, Rockwood und Mason werden zur Unterstützung der Hypothese, daß das Hämoglobin in der Zelle im gebundenen Zustande vorliege, herangezogen.

Ruszniak stellt sich den Erythrozyten als Gelscheibe vor, die wie jede Gallerte eine Gerüststruktur besitzt, in deren Maschen Eiweißstoffe, Serum und Wasser sich befinden. Das Hämoglobin selbst sei dagegen durch Adsorption an die Gerüststruktur gebunden. Die Hämolyse entsteht durch eine *Dispersitätsgradverminderung* der Gerüststruktur, durch die das Hämoglobin gezwungen wird, in die Außenlösung zu treten.

Konikow führt den Mechanismus der osmotischen Hämolyse ebenfalls auf kolloidchemische Vorgänge an der Erythrozytensubstanz zurück, die die Diffusion des Hämoglobins bewirken. Er stellt sich den Erythrozyten als ein System aus 2 Gelen, dem Stromagel und Hämoglobingel vor. Sobald das Hämoglobin aus dem Gelzustand in den Solzustand übergeht, diffundiert es durch das Stromagel, welches als Filter fungiert, in die umgebende Flüssigkeit. Die Durchlässigkeit des Stromafilters wird durch die Ionisation der entsprechenden Stromaproteine beeinflußt. Die Resistenz ist außerdem vom p_H abhängig. Handovsky nimmt eine wabige Struktur des Erythrozyten an. An der Oberfläche der einzelnen Waben sind Cholesterin, Lezithin, Hämoglobin und vielleicht auch Globin beteiligt. Der Zusammenhalt der Stoffe wird durch ein bestimmtes Salzmilieu aufrecht erhalten, welches dem der Umgebung angepaßt ist. Bei der osmotischen Hämolyse wird das Wabenwerk zerstört und das Hämoglobin geht in die umgebende Lösung.

Auf die übrigen Theorien der osmotischen Hämolyse soll nicht weiter eingegangen werden, da sie grundsätzlich nur wenig von den hier als wesentlich besprochenen Vorstellungen abweichen.

3. Fassen wir kurz die elektronenmikroskopischen Beobachtungen der vorstehenden Mitteilung zusammen, so ergibt sich folgendes: Die osmotische Hämolyse ist ein Diffusionsvorgang durch eine Membran, die bei der Hämolyse mechanisch intakt bleibt. Bei partieller Hämolyse beobachtet man eine Strukturierung des Resthämoglobins, die von der Art des Salzgemisches, in dem die Hämolyse stattgefunden

hat, abhängig ist. Beide Befunde lassen zahlreiche ältere Deutungen des Hämolysenvorganges ausschließen.

Es entfallen zunächst alle Deutungen, die nicht von der Ballonstruktur des Erythrozyten ausgehen (Rusznyak, Konikow, Handovsky). Auch die Annahme von Lepeschkin, daß das Hämoglobin im Erythrozyten in gebundener Form an Lipoiden vorliege und nach dem Wassereintritt in die Zelle eine Lipoidentmischung auftrete, bei der das Hämoglobin freigesetzt wird, wird unwahrscheinlich. Die elektronenmikroskopischen Präparate ergeben zwar auf dem Leuchtschirm nur schwarzweiß kontrastierte Bilder und ermöglichen keine elektive Erkennung der Lipoide. Da aber der gesamte Bestand des Erythrozyten an Lipoiden im Hämolyserest nachgewiesen wurde (Beumer und Bürger, Erikson und Mitarbeiter), der bereits von Wolpers elektronenoptisch als leere Membran erkannt worden ist, wird die Annahme unmöglich, daß Lipoide im Zellinnern sich entmischen und zu Tröpfchen zusammengeschlossen im hämolysierenden Erythrozyten auftreten.

Die Ruptur der Lipoidhülle (Ponder), oder die von Bechhold angenommene Lipoidentmischung der Membran lassen sich an den übermikroskopischen Abbildungen nicht sicher beweisen, da sich die angenommenen Vorgänge wahrscheinlich in zu kleinen Dimensionen bewegen. Man hat mit Veränderungen der Molekülanordnungen zu rechnen, für deren Darstellung das Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops noch nicht ausreicht.

Um nach dieser Kritik älterer Auffassungen den Vorgang der Hämolyse aus den elektronenmikroskopischen Ergebnissen zu verstehen und zu deuten, müssen zuerst noch weitere Tatsachen angeführt werden. Bellis und Scott haben an nichthämolysierten Erythrozyten, die im Plasma suspendiert waren, nachgewiesen, daß Proteinmoleküle von der Größe eines Serumeiweißmoleküls reversibel die Erythrozytenmembran passieren können. Wird Blut in vitro mit isotonischer Salzlösung gemischt, steigt der Proteingehalt im Plasma an, d. h. Proteine müssen aus den Blutzellen ins Plasma getreten sein. Wird aber zum Blut hypertronische Salzlösung zugesetzt, nimmt der Proteingehalt im Plasma ab, d. h. Proteine sind aus dem Plasma in die Blutzelle diffundiert.

Wenn wir als Voraussetzung für das Entstehen der Hämolyse eine Alteration der Membran gelten lassen, so könnte die geringe Porendehnung ein unterstützender Faktor für den Hämoglobinverlust der Zelle sein. Außerdem lassen sich aber Gründe für eine Zustandsänderung des Hämoglobins im Erythrozyten anführen, was von wesentlich größerer Bedeutung für die Entstehung der Hämolyse zu sein scheint. In den elektronenmikroskopischen Bildern ist die Feinheit der Körnung

partiell hämolysierter Zellen von dem Salzgemisch im Suspensionsmedium abhängig, in dem die Zelle fixiert wurde. Das legt den Gedanken nahe, daß hier nicht nur Fixations- und Eintrocknungseffekte, sondern Änderungen des Assoziationsgrades der Hämoglobinmoleküle vorliegen, die für den Hämolysevorgang von Bedeutung sein können. Tatsächlich wies ANDERSSON an wechselnden Sedimentationskonstanten des Pferdehämoglobins nach, daß das Hämoglobin in Salzlösung von 0,5—1,0 molar in Moleküle vom halben Molekulargewicht gespalten wurde. Weitere Erhöhung der Salzkonzentration bewirkte keine Änderung der Sedimentationskonstanten mehr. Ein ähnliches Verhalten wurde auch am Hämoglobin des Menschen nachgewiesen (SVEDBERG). Was also am aufgetrockneten Erythrozyten vermutet werden kann, läßt sich am Lösungszustand des Hämoglobins direkt beweisen. Die Veränderlichkeit des Assoziationsgrades ist eine weit verbreitete Eigentümlichkeit hochmolekularer Proteine.

In Versuchen mit Thyreoglobulin zeigte LUNDGREEN, daß Dissoziation und Assoziation der Thyreoglobulinmolekel ebenfalls hochgradig von der Konzentration des in Lösung vorhandenen Salzes abhängt (MEYER-MARK). STEINHARDT erzielte eine totale Dissoziation von Pferdehämoglobin in halbe Molekel durch Zusatz von Harnstoff und andere Amide, während z. B. Pepsin unter gleichen Bedingungen unverändert blieb. Edestin nimmt in Harnstofflösung ebenfalls ein Molekulargewicht von 50000 gegenüber 300000 in wäßeriger Lösung an. Auch Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration können zur Dissoziation von Eiweißmolekülen führen. In gewissen Grenzen sind diese Erscheinungen reversibel. STEINHARDT führt die Wirkung der Amide auf einen Stereopolarisationsmechanismus zurück, der auf dem wiederholten Vorkommen der Amidbindung in der konstituierenden Polypeptidkette der Proteine beruht (SVEDBERG).

Nach HILL weisen die Schwankungen der Sauerstoffsättigungskurve beim selben Individuum unter Berücksichtigung aller möglichen methodischen Fehler ebenfalls auf verschiedene Assoziationsgrade des Hämoglobins hin. Die Sauerstoffsättigungskurve ist außerdem abhängig von dem Salzgemisch, das innerhalb der Erythrozyten nach ABDERHALDEN für jede Tierart charakteristisch ist.

4. Wir können deshalb annehmen, daß die Hämoglobinlösung im Erythrozyten polymolekular ist, d. h. daß mehrere Moleküle jeweils zu einem größeren Verband assoziiert sind. Wird nun bei der osmotischen Schwellung der Wassergehalt des Erythrozyten herauf- und der Salzgehalt herabgesetzt, so tritt eine Dissoziation in Einzelmoleküle ein. Diese sind dann in der Lage, durch die Membran zu diffundieren, auch wenn die Porendehnung nur sehr geringfügig ist. Das osmotische Wassergleichgewicht des Erythrozyten in hypotonischer Salzlösung ist in wenigen Sekunden erreicht. Aber erst nach einer gewissen Latenzzeit, wenn die Assoziate gespalten sind, diffundiert das Hämoglobin durch das Maschenwerk der Membran. Eine geringgradige Dehnung der Poren wird dann im Finalstadium der osmotischen Schwellung die Diffusion beschleunigen (Siebeffekt). Sie ist aber nicht der ausschlaggebende Faktor der osmotischen Hämolyse. Die

Dissoziationstheorie macht verständlich, daß das hämolytische Volumen je nach dem Salzgemisch im Suspensionsmedium bei verschiedenem osmotischen Druck erreicht wird, wofür die klassische Theorie keine befriedigende Erklärung fand. Da wir annehmen, daß das Hämoglobin im Erythrozyten eine vom Salzgemisch abhängige Stabilität der Assoziate besitzt, die unter den verschiedensten Bedingungen in die diffusible Größe dissoziieren, kann der Mechanismus der osmotischen Hämolyse auch in dieser Hinsicht mit der Dissoziationstheorie genügend erklärt werden.

III. Morphologie einer Hypertonie-Hämolyse.

Eine weitere Stütze für die Dissoziationstheorie ergeben die elektronenmikroskopischen Untersuchungen einer in hypertonischer Salzlösung auftretenden Hämolyse, deren Morphologie in der vorliegenden Mitteilung beschrieben wird. Auch die Hypertoniehämolyse ist ein Diffusionsvorgang. Die elektronenmikroskopischen Befunde lassen sich mit der von Hamburger und Bechhold entwickelten Vorstellung, daß infolge der Osmosedifferenz ein Schrumpfen des Erythrozyten eintritt und die Membran dabei platzt, oder mit der Annahme von Acél und Lorber, daß eine Quellung des Erythrozyten auftritt und die Zelle schließlich aufgelöst wird, nicht vereinbaren. Wie noch gezeigt wird, ergeben die in einer hypertonischen Salzlösung hämolysierenden Erythrozyten gegenüber den im hypotonischen Milieu untergehenden Zellen neben vielen gemeinsamen Veränderungen einige abweichende morphologische Befunde, auf die besonders eingegangen wird, da an ihnen gezeigt werden kann, daß der die Hämolyse auslösende Faktor nicht in einem schwellungsbedingten Erreichen der Dehnungskapazität der Membran liegt.

Lichtmikroskopisch kann man unter geeigneten Bedingungen nachweisen, daß die Erythrozyten in einer hypertonischen Salzlösung bis zur eintretenden Hämolyse 3 Phasen durchlaufen. In der Initialphase nehmen die Erythrozyten aus der physiologischerweise vorherrschenden Scheibenform Kugelformen an. Wie im hypotonischen Milieu finden auch hier die Gestaltveränderungen der einzelnen Erythrozyten in verschiedenen Zeitabläufen statt. In der 2. Phase beginnen dann die kugelförmigen Erythrozyten zu schrumpfen. Nach und nach gehen diese Schrumpfformen wieder in unregelmäßige Scheibenformen über, die wie gedunsen aussehen und nun fast unmerklich und nur allmählich blasser werden. Eine weitergehende Strukturanalyse ist mit den Methoden der Lichtmikroskopie nicht möglich.

Methodik.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Hypertoniehämolyse wurden NaCl-Suspensionsreihen mit steigendem Kochsalzgehalt (0,9—20% NaCl)

angesetzt und nach 1—15 Stunden zentrifugiert. Die verschiedenen Hämolysegrade lassen sich aus den Sedimenten der genannten Suspensionsreihen durch die verschiedenen Hämolysezeiten sehr gut erfassen. Die Sedimente wurden nach der bereits angegebenen Methode präpariert und elektronenmikroskopisch untersucht.

Ergebnisse.

Wenden wir uns nun zu der Beschreibung hämolysierender Erythrozyten, bei der wir uns, um Wiederholungen zu vermeiden, nur auf die neu entgegentretenden typischen von der Hypotoniehämolyse abweichenden Veränderungen beschränken wollen. Wir gehen wieder

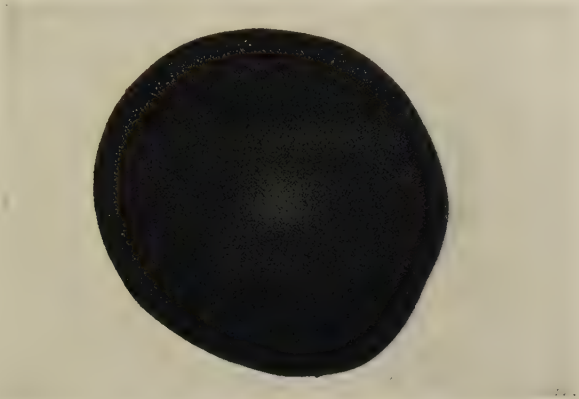


Abb. 12. Normaler reifer Erythrozyt des Menschen. Osmiumfixation. El. opt. 1:10000.

von dem normalen, reifen, kernlosen, im peripheren Blut kreisenden Erythrozyten des Menschen aus, der elektronenoptisch als schwarze Scheibe mit nur schwach durchstrahlbarem strukturlosem Zentrum auf dem Leuchtschirm erscheint (Abb. 12). Die kugelförmigen Erythrozyten der Initialphase ergeben durchgehend schwarze Scheibenbilder, wie sie uns schon von der Beschreibung der Sphärozyten der hypotonischen Reihen her bekannt sind. In der nun eintretenden Schrumpfungsphase kommen bizarre Gestaltformen mit zahlreichen gestaltlichen Variationen zur Darstellung, auf die im einzelnen nicht weiter eingegangen werden soll, und die ein überzeugendes Bild von der individuell verschiedenen Reaktionsweise einer Erythrozytenpopulation abgeben (Abb. 13 und 14). Die Schrumpfformen lassen sich mit den uns bekannten Stechapfelformen der Hypotoniereihe nicht vergleichen und erinnern am ehesten an die Zellformen, die wir bei partiell hämolysierten mit Zenker-scher Lösung fixierten Erythrozyten gesehen haben. Die geschrumpften Zellen haben nur selten schmale Ausläufer, häufiger breitbasig aufsitzende knollenartige Auswüchse von unregelmäßiger Form. Auch die in einer hypotonischen Salzlösung teilhämolysierten Erythrozyten,

die anschließend in einer hypertonischen Salzlösung einem Schrumpfungsprozeß unterlagen, unterscheiden sich deutlich durch ihre schmalen, unregelmäßig geformten Ausläufer von den mehr knolligen Auswüchsen

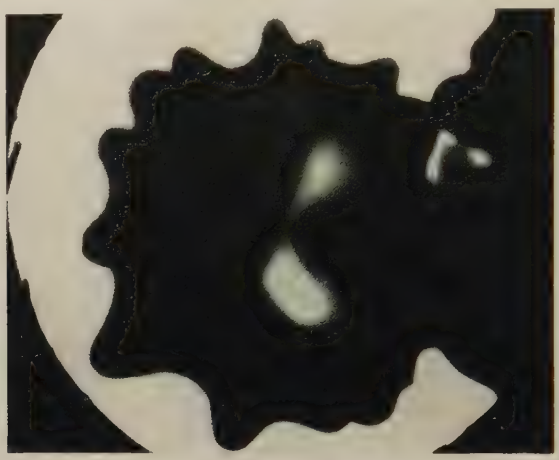


Abb. 13. Schrumpfform. Osmiumfixation. El. opt. 1:9000.

der geschrumpften nichthämolysierten Zellen. In der 3. Phase nehmen diese geschrumpften Zellen wieder Scheibenformen an, die aber sehr häufig die zentrale Eindellung vermissen lassen und daher mehr

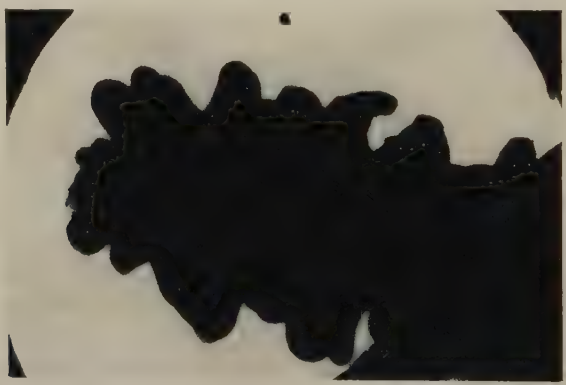


Abb. 14. Schrumpfform. Profilansicht. Osmiumfixation. El. opt. 1:9000.

elliptischen Diskusformen gleichen. Bei der bikonkaven Scheibenform (Bisquitform) setzt sich die zentrale Aufhellungszone scharfrandig vom dunklen Randsaum ab, während bei der Diskusform das helle Zentrum allmählich in den dunklen Randsaum übergeht (Abb. 15). Aus diesen Scheibenformen beginnt der Erythrozyt zu hämolysieren und die zentrale Aufhellungszone wird jetzt zunehmend heller. Zuweilen läßt

der Außenrand solcher hämolysierender Zellen seesternartige Ausläufer erkennen oder ist wellig konturiert. Häufig beobachtet man in dem nun für die Elektronenstrahlen gut durchstrahlbaren Zentrum der teilhämolysierten Zellen wolkige Verschattungen. Nimmt die Hämolyse weiterhin zu, werden jetzt auch feingekörnte Strukturen im Erythrozyteninnern sichtbar, die aber im Gegensatz zu den teilhämolysierten Zellen der hypotonischen Reihe nicht die scharfrandigen und ungleich großen Kugeln und Körner aufweisen, sondern im ganzen

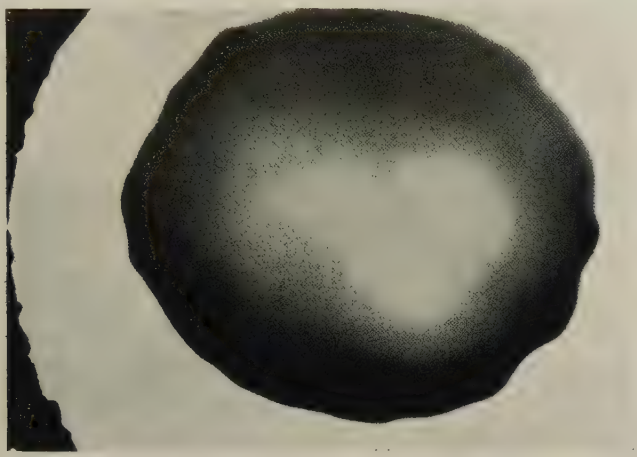


Abb. 15. Hämolysierender Erythrozyt in der Diskusform. Osmiumfixation. El. opt. 1:10000.

mehr diffus in die Umgebung zerfließen. Auch die Membran erscheint mitunter fleckig gezeichnet. In einzelnen Erythrozyten bemerkt man nun eine feine Körnelung des Resthämoglobins, die gleichmäßig im Erythrozyteninnern verteilt ist und nur manchmal am Rande oder in Längsfalten der Membran gehäuft auftritt und so als dunkler Randsaum erscheint (Abb. 16). Andere Erythrozyten lassen wieder im Innern wolkige Verklumpungen erkennen. Bei fortschreitender Hämolyse wird die Scheibe im ganzen zunehmend heller, so daß die feine gleichmäßige Körnelung deutlicher hervortritt. Diese Bilder lassen sich am ehesten mit den Strukturen in den aufgelockerten Randsäumen der teilhämolysierten Sphärozyten der hypotonischen Plasmareihe vergleichen. Endzustand der Hämolyse ist wieder die nahezu leere Erythrozytenmembran, die vereinzelt längsgefältelt ist und in der vermehrt, letzte zum Teil wohl nicht mehr diffusible Reste des Zellinhaltes verbleiben, die sich in den Längsfalten vorwiegend anhäufen. Die im hypotonischen Milieu dargestellten Membranen unterscheiden sich aber durch ihren Faltenreichtum von den nur Längsfalten aufweisenden Membranen der Hypertoniehämolyse. In

der Endphase werden auch mit geringen Hämoglobinresten gefüllte Erythrozyten-Membranen gesichtet, an denen ein feinporiges Maschenwerk hervortritt. Es kann hierbei vermutet werden, daß eine kolloidchemische Alteration im Sinne eines Denaturierungsprozesses eingetreten ist, wodurch das denaturierte Stromatin-Membranskelet zum Vorschein kommt.

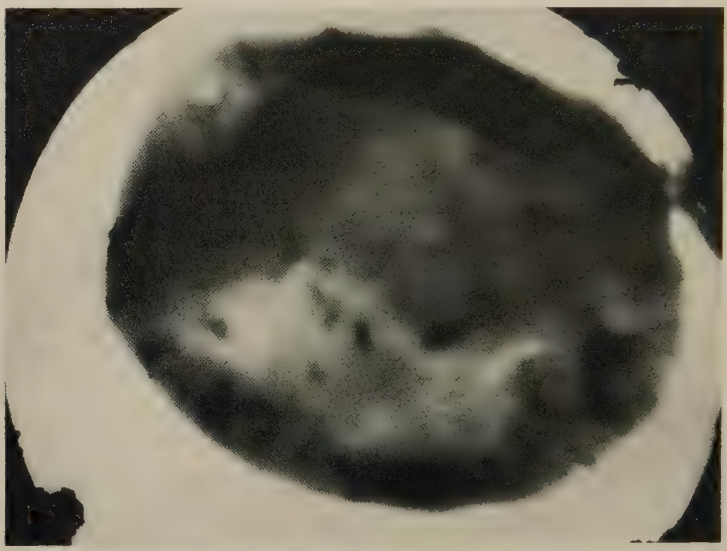


Abb. 16. Hämolysierender Erythrozyt. Osmiumfixation. El. opt. 1:12000. Präparat und Aufnahme C. Wolpers.

Besprechung.

Versuchen wir den Ablauf einer Hypertoniehämolyse aus den verschiedenen morphologischen Zustandsbildern zu rekonstruieren, so läßt sich der Vorgang folgendermaßen beschreiben: Nachdem die Erythrozyten in der hypertonischen Salzlösung Kugelform angenommen haben, beginnen sie durch Wasserverlust zu schrumpfen. Nach einer gewissen Zeit gehen aus diesen Schrumpfformen wieder Scheiben hervor. Im Gegensatz zur hypotonischen Hämolyse, bei der das Hämoglobin aus dem kugelförmigen Erythrozyt in die Außenlösung diffundiert, beginnt der Erythrozyt in der hypertonischen Salzlösung aus der Scheibenform zu hämolysieren. Das Hämoglobin diffundiert durch die mechanisch intakte Membran. Ein Platzen der Membran (Hamburger, Bechhold) oder eine bis zur Auflösung zunehmende Quellung des Erythrozyten (Acél und Lorber) wurde nicht beobachtet. Für die Hypertoniehämolyse hat die Hofmeister-sche Ionenreihe die gleiche Gültigkeit, wie für die in hypotonischer

Salzlösung auftretende Hämolyse, ein Befund, dem im Sinne der Dissoziationstheorie eine neue Bedeutung zukommt. Mit beginnendem Elektrolytenausgleich gehen aus den Schrumpfformen Scheiben hervor, die langsam hämolysieren. In den partiell hämolysierten Erythrozyten beobachteten wir im Innern gleichmäßig verteilte, feingekörnte Strukturen, deren Anzahl entsprechend dem Hämolysegrad geringer werden. Wir können daher annehmen, daß die physiologischen polymolekularen Assoziate, die der Ausdruck des besonderen Innengefüges sind, in die diffusible Größe zerfallen und durch die mechanisch intakte Membran diffundieren. Eine für die Auslösung der Hämolyse vielleicht in Betracht kommende kolloidchemische Alteration der Erythrozytenmembran läßt sich, darauf wurde schon in der vorangehenden Mitteilung hingewiesen, an den übermikroskopischen Abbildungen nicht sicher beweisen, kann aber mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Der Gestaltwandel des Erythrozyten von der bikonkaven Scheibe über die Kugel- und Schrumpfform zur Scheibenform ohne zentrale Eindellung ist wahrscheinlich durch einen reversiblen Spannungswechsel der Membran zu erklären, die auf bestimmte Reize in ihrem Spannungszustand nachläßt. In der erschlafften Form gleicht sie einer Ballonhülle, aus der dann die verschiedensten Gestaltformen entstehen können. Ihre natürliche Gestalt ist die gespannte bikonkave Scheibe, um dem Erythrozyt die für die Sauerstoff übertragende Funktion so wichtige Gestaltform zu geben, und aus dieser bikonkaven Scheibenform beginnt der Erythrozyt zu hämolysieren.

Auf Grund der elektronenmikroskopischen Strukturanalyse hämolysierender Erythrozyten kann also angenommen werden, daß das physiologisch im Erythrozyteninnern polymolekulare Assoziate bildende Hämoglobin wie bei der hypotonischen Hämolyse so auch bei der Hypertoniehämolyse in eine diffusible Größe zerfällt und durch die Membran in die Außenlösung diffundiert. Endzustand ist die nahezu hämoglobinleere längsgefältete Erythrozytenmembran, an der im Beginn der Hämolyse eine kolloidchemische Alteration sich elektronenoptisch nicht sicher nachweisen, vielmehr aus dem funktionellen Zustand mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ausschließen läßt. Erst in der Endphase werden Erythrozyten-Membranen gelichtet, die auf eine kolloidchemische Alteration im Sinne eines Denaturierungsprozesses schließen lassen.

Zusammenfassung.

1. Die osmotische Hämolyse ist ein Diffusionsvorgang, bei dem das Hämoglobin aus dem kugelförmigen Erythrozyt durch die mechanisch intakte Membran diffundiert. Endzustand der osmotischen Hämolyse ist die nahezu leere, gefaltete Erythrozytenmembran.

2. Die körnige Strukturzeichnung partiell hämolysierter Erythrozyten ist von der Art des Salzgemisches im Suspensionsmedium abhängig.

3. Partiell hämolysierte Sphärozyten nehmen im isotonischen Milieu wieder bikonkave Scheibenformen an. Der Gestaltwandel ist nur bedingt reversibel.

4. Vom typischen Verlauf abweichende Gestaltveränderungen partiell hämolysierter Erythrozyten werden besprochen.

5. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der osmotischen Hämolyse im Verein mit den Befunden der Ultrazentrifugenanalysen von Hämoglobinlösungen und Lösungen anderer Proteine ermöglichen die Annahme, daß das Hämoglobin in der roten Blutzelle Assoziationskomplexe bildet. Durch die osmotisch bedingte Schwellung und den Salzverlust des Erythrozyten dissoziiert wahrscheinlich das Hämoglobin in die diffusible Größe und diffundiert durch die unter bestimmten Bedingungen für Proteine von der Größe der Serumeiweißmoleküle permeable Membran.

Eine geringgradige Dehnung der Membranstruktur, wie sie die klassische Theorie annimmt, beschleunigt dann die Diffusion (Sieb-effekt). Sie ist aber als Ursache der Hämolyse nicht von primärer Bedeutung.

6. Auch die in einer hypertonischen Salzlösung auftretende Hämolyse ist ein Diffusionsvorgang, bei dem das Hämoglobin durch die mechanisch intakte Membran in die Außenlösung diffundiert.

7. Die bei der osmotischen Hämolyse auftretenden Gestaltveränderungen der Erythrozyten sind wahrscheinlich als Folge eines Spannungswechsels der Membran zu deuten, deren physiologische Form die bikonkave Scheibe darstellt.

Herrn Prof. Heubner, Berlin und Herrn Dr. C. Wolpers, Lübeck. bin ich für wertvolle kritische Hinweise zu Dank verpflichtet, dem letztgenannten auch für 2 Aufnahmen, die er zur Verfügung gestellt hat.

Literatur.

Acél, D. u. L. Lorber: Biochem. Z. **147**, 557 (1924). — Andersson, K. J. I.: Unveröffentlicht, s. Svedberg. — Barelt, A. M.: J. Path. a. Bacter. **46**, 603 (1938). — Bechhold: Kolloide in Biologie und Medizin, 2. Aufl. 1919. — Bechhold, H.: Münch. med. Wschr. **1921**, 127. — Bechhold, H. u. W. Krause: Biochem. Z. **109**, 227 (1920). — Bellis, C. J. and F. H. Scott: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **29**, 1105 (1931/32). — Beumer, W. u. Bürger: Arch. exper. Path. (D.) **71**, 311 (1913). — Borries, B. v. u. E. Ruska: 95. Verh. Ges. dtsch. Naturf. u. Ärzte **1938**, 72. — Naturw. **27**, 281 (1939). — Erg. exakt. Naturw. **19**, 237 (1940). — Castle, W. B.: Arch. int. Med. (Am.) **60**, 949 (1937). — Collander, C.: Ber. physiol.-ökon. Ges. Königsberg **69**, 251 (1937). — Commandon, J. et de Fonbrune: C. r. Soc. Biol. **95**, 635 (1926). — Davson, H. and E. Podner: Biochem. J. (Brit.) **32**, 756 (1938). — Ege, R.: Biochem. Z. **115**, 175 (1921):

130, 99, 116 (1922): **134**, 234 (1923). – Erickson, B. N., H. H. Williams, S. S. Bernstein, J. Avrine, R. L. Jones and J. G. Macy: J. biol. Chem. (Am.) **122**, 515 (1938). — Hamburger: Osmotische Druck- und Ionenlehre. Wiesbaden 1902. — Hamburger, H. J.: Z. Biol. **28**, 405 (1891). — Zbl. Physiol. **7**, 161 (1893). — Z. Biol. **35**, 252 (1897). — Handovsky, H.: Handbuch der allgemeinen Hämatologie, Bd. II 2, S. 701. 1934. — Henle, J.: Allgemeine Pathologie. Leipzig 1841. — Hill: J. Physiol. (Brit.) **40**, 4 (1930). Jacobs, M. H.: Biol. Bull. (Am.) **58**, 104 (1938); **60**, 95 (1931); **62**, 178 (1932). — Jung, F.: Klin. Wschr. **1942**, 917. — Koeppe, H.: Pflügers Arch. **67**, 189 (1897). — Konikow, A.: Kongr.zbl. inn. Med. **45**, 66 (1927); **51**, 468 (1928). — Lepeschkin, W. W.: Fol. haematol. (D.) **54**, 53 (1936). — Nature **138**, 122, (1936). — Protoplasma (D.) **21**, 2 (1938). — J. chem. Phys. **6**, 177 (1938). – Leuwenhoek: Philos. Transact. **1674**. Ref. Henle. — Lundgreen, H. P.:Skand. Naturforsch. **1936**, 551. — Nature **143**, 896 (1939). — Meyer, K. H. u. H. Mark: Hochpolymere Chemie, Bd. II. Leipzig 1940. — Mond, R. u. F. Hoffmann: Pflügers Arch. **219**, 467 (1928). — Moore, B. and H. E. Roaf: Biochem. J. (Brit.) **3**, 55 (1908). — Natansohn, A.: Jb. Bot. **39**, 607 (1904). — Ponder: Protoplasma (D.) **1934**. — Rockwood, R. and E. C. Mason: J. Labor. a. clin. Med.: (Am.) **10**, (1925). — Ruska, H.: Naturw. **27**, 287 (1939). — Dtsch. med. Wschr. **1941**, 281. — Ruszniak, S.: Biochem. Z. **36**, 394 (1911). — Schmidt, W. I.: Kolloid-Z. **85**, 137 (1938). — Schmidt, F. O., R. Bear and E. Ponder: J. cellul. a. comp. Physiol. **9**, 89 (1936). — Schönheyde, F.: Skand. Arch. Physiol. (D.) **71**, 39 (1934). — Seifritz: Protoplasma (D.) **1**, 345 (1927). — Steinhardt: J. biol. Chem. (Am.) **123**, 543 (1938). — Svedberg, The u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge. Dresden u. Leipzig 1940. — Takei, T.: Biochem. Z. **123**, 104 (1921). — Warburg, E. J.: Biochem. Z. **16**, 153 (1922). — Pflügers Arch. **145**, 277 (1912). — Weidenreich: Pflügers Arch. **132**, 143 (1910). — Winge, K. u. E. Warburg: Acta med. scand. (Schwd.) Suppl. **26**, 500 (1928). — Winkler, K. A. u. Bungenberg de Jong, H. S.: Arch. néerl. Physiol. **25**, 431 (1941). — Wolpers, C.: Naturw. **28**, 416 (1941). — Klin. Wschr. **1942**, 1049. — Wolpers, C. u. H. Ruska: Klin. Wschr. **1939**, 1077, 1111. — Wolpers, C. u. K. Zwickau: Fol. haemat. (D.) **66** 211 (1942).

Aus dem Strahleninstitut des Allg. Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G., Forschungsanstalt Insel Riems bei Greifswald (Prof. Dr. H. Ruska).

Zur Morphologie einer mechanischen Hämolyse.

(Über die Hämolyse als Strukturproblem.)

Von

B. Lindemann.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Mai 1948.)

1.

Unter den verschiedenartigsten mechanischen Einwirkungen hämolysieren Erythrozyten in vitro, d. h. es tritt ein Hämoglobinverlust der roten Blutzelle auf. Bei dem Blut mancher Tiere genügt einfaches Schütteln. Im allgemeinen werden derartige durch mechanische Energieeinwirkung erzeugten Hämolyseformen als *nichtosmotische* Hämolysen bezeichnet und von den Hämolysen, wie sie in Wasser, in hypotonischen Salzlösung und in Lösung eindringender Substanzen eintreten, den sog. *osmotischen* Hämolysen, abgegrenzt. Es wird angenommen, daß infolge der mechanischen Gewalteinwirkung durch die entstehenden Druckdifferenzen die Strukturen der Erythrozytenmembranen zerrissen werden und dadurch der Zellinhalt, das Hämoglobin, in Lösung geht. Wie im einzelnen noch gezeigt wird, kann aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen hämolysierender Erythrozyten angenommen werden, daß auch eine mechanische Hämolyse entgegen den vielfach vertretenden Anschauungen, neben der nichtosmotischen auch eine osmotische Komponente erkennen läßt, wobei allerdings je nach Gewalteinwirkung die erstgenannte überwiegen kann. An partiell hämolysierten Erythrozyten kann elektronenoptisch nachgewiesen werden, daß ein Teil des Zellinhaltes, der bekanntlich vorwiegend aus Hämoglobin besteht, durch Diffusion verlorengegangen sein muß.

Unter osmotischer Hämolyse verstehen wir einen Diffussionsvorgang, bei dem primär das im Erythrozyteninnern polymolekulare Assoziate bildende Hämoglobin in eine diffusible Größe zerfällt und durch die mechanisch intakte Membran in die Außenlösung diffundiert und nicht das durch osmotische Schwellung bedingte Überschreiten der Dehnungskapazität der Membran, wodurch eine Hämolyse nicht ausgelöst, sondern nur die Diffusion beschleunigt wird.

2.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung einer mechanischen Hämolyse wurde Kaninchenzitratblut mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, zentrifugiert und das Sediment 30 Min. im Mörser zerrieben. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,9% NaCl-Lösung und Entfernen der überstehenden Hämoglobinlösung wurde das Sediment sofort mit Osmium fixiert und nach der bereits

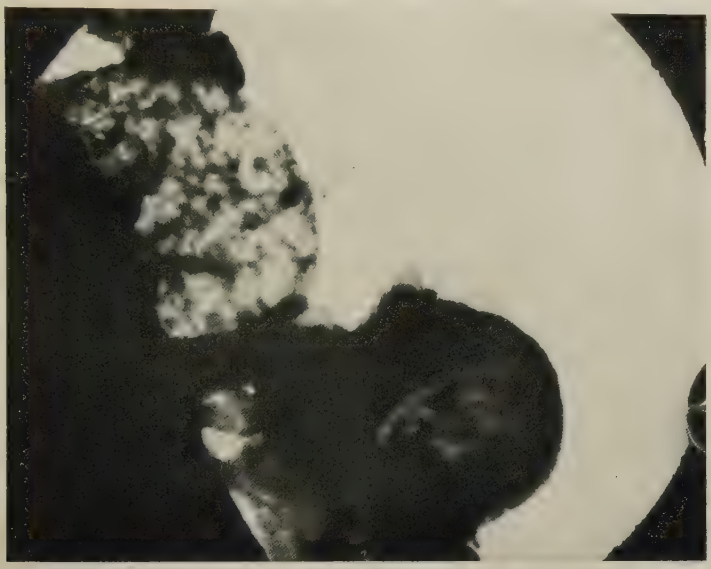


Abb. 1. Partiell hämolysierter Erythrozyt. Osmiumfixation. El. opt. 1:8700.

geschilderten Methode für die elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert (Abb. 1).

Auf der 1. Abbildung treten uns im Blickfeld eine teilhämolysierte Zelle neben nahezu hämoglobinleeren Hüllen entgegen. An dem teilhämolysierten scheibenförmigen Erythrozyt erkennen wir deutlich in der vergrößerten zentralen Aufhellungszone eine körnige Anordnung des Resthämoglobins. Die körnige Strukturierung des Hämoglobins hat eine verschiedene Größe. Solche Bilder haben wir bereits bei den osmotisch teilhämolysierten Zellen der Hypotoniereihe kennengelernt, die nach eingetretener Hämolyse im isotonischen Milieu aus der Kugelform in eine bikonkave Scheibe überwechselten (Abb. 2). In der 2. Abbildung ist eine fast vollständig hämoglobinleere Erythrozytenmembran abgebildet. Die körnig angeordneten Hämoglobinreste sammeln sich im Zellinnern, zumeist in den Membranfalten an. Der Membran haften Reste zerriebener Zellen an, die am Rande als kleine

Schollen erscheinen. Die nächstfolgende Abbildung gibt uns einen weiteren charakteristischen Befund einer mechanischen Hämolyse wieder (Abb. 3). Wir sehen vor uns hämoglobinleere Hüllen, die zerfetzt sind und auch zerrissene Membranen und Teilstücke von Erythrozytenhüllen. Neben diesen zerfetzten Membranen zerriebener roter Blutzellen liegen stark deformierte Hüllen und hämoglobinleere, zum Teil intakte Erythrozytenhüllen.

Abb. 2. Nahezu hämoglobinleere Erythrozytenhülle. Osmiumfixation. El. opt. 1:7900.

Partiell hämolysierte Erythrozyten, nahezu hämoglobinleere, zum Teil noch intakte Membranen und zerfetzte Erythrozytenhüllen sind die 3 typischen Befunde einer mechanischen Hämolyse.

3.

Versuchen wir aus den verschiedenen morphologischen Zustandsbildern den Ablauf einer mechanischen Hämolyse zu beschreiben und den Hämolysevorgang zu deuten. Wir sahen auf den elektronenoptischen Abbildungen einer auf mechanischem Wege erzeugten Hämolyse neben partiell hämolysierten Erythrozyten hämoglobinarme Hüllen und zerfetzte Membranen. Unter der grobmechanischen Gewalteinwirkung ist ein Teil der Zellen zerrieben worden und vollständig hämolysiert. Das Beispiel des teilhämolysierten Erythrozyten zeigt uns aber, daß wahrscheinlich ein geringer Prozentsatz der roten Blutzellen nur einer wechselnden Kompressionswirkung ausgesetzt

war, wodurch die Erythrozytenmembran mechanisch intakt blieb und ein Teil des Zellinhaltes durch Diffusion verloren ging. Die zytoplasmatötende Wirkung leichter Drucke ist bekannt und wird von den Zellphysiologen als Beweis für eine Gerüststruktur des Zytoplasmas angesehen, dessen Haftpunkte dabei gewaltsam gesprengt werden. Aus den Untersuchungen von EBBECKE wissen wir, daß unter der Kompressionswirkung die Erythrozyten aus der physiologisch vorherrschenden Scheibenform in Kugelformen übergehen, die dann, wenn die

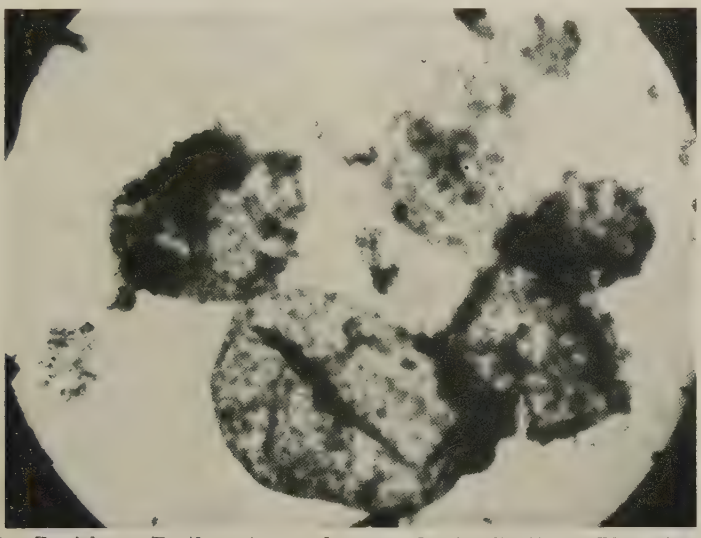


Abb. 3. Zerriebene Erythrozytenmembranen. Osmiumfixation. El. opt. 1:8700.

Kompression anhält, im Verlauf von Minuten allmählich und fast unmerklich bis zum Schatten abblassen. An den partiell hämolysierten Zellen sahen wir im Innern eine körnige Strukturierung des Resthämoglobins. Wir können daher annehmen, daß durch die mechanische Druckwirkung ein Zerfall des physiologischen molekularen Innengefüges eintritt und die polymolekularen Assoziate des Hämoglobins in eine diffusible Größe zerfallen, die dann imstande sind, durch die mechanisch intakte Membran zu diffundieren. Einen analogen kolloidchemischen Vorgang finden wir in der als Thixotropie bezeichneten Erscheinung, die als eine auf mechanischen Wege erzeugte isotherme Gel-Sol-Gel-Umwandlung difiniert wird. Bei mechanischer Beanspruchung werden Gele von zahlreichen anorganischen und organischen Substanzen verflüssigt, die beim ruhigen Stehen wieder gelieren, um beim Schütteln sich wieder sofort zu verflüssigen. Der Vorgang ist reversibel. Die jeweils charakteristische Erstarrungszeit wird schon durch sehr geringe Zusätze von Elektrolyten verändert. Bei vorwiegend quellbaren Gelen tritt die

Thixotropie nur in einem begrenzten Gebiet vorübergehend auf. Man kann annehmen, daß bei den elektrisch nicht geladenen Teilchen dabei Änderungen in der Packung derselben auftreten. So beträgt z. B. bei kugelförmigen Teilchen das eingeschlossene Hohlraumvolumen 66%, wenn nur 4 Teilchen sich berühren, und 26%, wenn 12 Kugeln sich berühren. Läßt der mechanische Druck nach, ordnen sich die Hämoglobinmoleküle wieder in Assoziationskomplexen verschiedener Größe an und es resultiert der teilhämolysierte Erythrozyt, dessen zentrale Aufhellungszone dem Hämolysegrad entspricht und körnig strukturiert ist.

Frl. E. Hirschfeld dankt der Verfasser für ihre experimentelle Hilfe und Herrn Prof. Dr. W. Heubner, Berlin, für die wertvollen kritischen Hinweise.

Literatur.

Ebbecke, U.: Pflügers Arch. **239**, 5, 533 (1937). — Freundlich, H.: Thixotropy. Paris 1935. — Freundlich, H. u. H. L. Röder: Trans. Faraday Soc. **34**, 308 (1938). — Houwink, R.: Elastizität, Plastizität und Struktur der Materie. Dresden u. Leipzig 1938. — Manegold, E., R. Hofmann u. K. Solf: Kolloid-Z. **56**, 142 (1921). — Ostwald, Wo.: Kolloid-Z. **46**, 252 (1928); **78**, 327 (1937). — Schmidt, W. J.: Verh. dtsch. zool. Ges. **1939**, 303.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.

Über die Wirkung von Plasma, Serum und Mellanby-Thrombin auf die Hämiglobinbildung nach Hämolyse.

Von

Hans Friedrich Zipf.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Mai 1948.)

Durch ausgedehnte Untersuchungen von W. Heubner[1] und seinen Mitarbeitern[2, 3, 4] ist ein wichtiges physiologisches Fermentsystem in den roten Zellen aufgezeigt worden. Es handelt sich um Enzym-Substratsysteme, die, aus dem Vorgang der Gärung in den Erythrozyten stammend, die sinnvolle Aufgabe übernehmen, den Blutfarbstoff in seinem funktionsfähigen Zustand zu erhalten. Dies geschieht durch laufende Reduktion desjenigen Hämiglobinanteils, der den physiologischen Anteil im Blute überschreiten könnte. Wären diese reduzierenden glykolytischen Faktoren im Blute nicht vorhanden, dann würde durch die O_2-Konzentration des Blutes binnen kurzem das Hämoglobin in Hämiglobin (Methämoglobin) umgewandelt werden. Als reduzierende Gärungsprodukte kommen beim Menschen nach Kiese[2] besonders Glyzerinaldehydphosphat und Hexosemonophosphat in Frage, die unter Mitwirkung bestimmter zusätzlicher Fermente das Hämiglobin zu Hämoglobin rückbilden, beim Kaninchen vor allem ein Milchsäure-Milchsäuredehydrasesystem.

Außerhalb der roten Zellen, nach Hämolyse, verlieren diese Reduktionssysteme beträchtlich oder ganz an Wirksamkeit, so daß die Frage berechtigt erscheint, ob ausgetretenes Hämoglobin im Plasma gegenüber einer Umwandlung in Hämiglobin noch geschützt ist. Man kann aber auch mit anderen Worten fragen, *ob der Abbau des Hämoglobins schon im Blutstrome beginnt*, unter der Voraussetzung, daß man die Hämiglobinbildung als erste Stufe auf dem Wege zum weiteren Blutfarbstoffabbau betrachtet.

Hämoglobinlösungen sind eine Zeitlang als Blutersatzflüssigkeit diskutiert worden (Amberson und Mitarbeiter[5, 6]); es ist andererseits wegen der im Tierexperiment beobachteten schweren Nieren- und Lungenveränderungen ausdrücklich davor gewarnt worden (Aubertin, Lacoste und Castagnou[7]). Immerhin konnten Amberson und Mitarbeiter beweisen, daß man bei Hunden, Katzen und Kaninchen das Blut praktisch vollkommen durch eine 12—14%ige Hämoglobinlösung ersetzen kann. Für viele Stunden zeigten dabei die Tiere ein normales Verhalten. Allmählich nur geht das Hämoglobin in Hämiglobin über und verschwindet aus der Blutbahn.

Die Frage der Beständigkeit des Hämoglobins innerhalb des Blutplasmas „in vivo" quantitativ und zeitlich zu klären, ist sicherlich nicht einfach, da Hämoglobin aus der Blutbahn verschwinden kann. Es wurde deshalb der Versuch gemacht, durch Veränderung der

Bedingungen des Hämoglobinabbaues in vitro die Frage zu beantworten, ob im Blutplasma Faktoren vorhanden sind, die auch dem ausgetretenen Farbstoff einen weitgehenden Schutz gewähren und seine Umwandlung in Hämiglobin verzögern. Im Verlaufe der Untersuchungen ergab sich ein entgegengesetztes Verhalten von Serum gegenüber Plasma, was uns veranlaßte, auch Thrombinlösungen und -pulver (nach MELLANBY und BLEIBTREU) in den Rahmen dieser Arbeit mit einzubeziehen.

Methodik.

Wir haben bei klinischen Blutuntersuchungen auf Hämiglobin die Erfahrung machen müssen, daß sich in den zur Messung benutzten verdünnten Blutlösungen an der Luft spontan Hämiglobin bildete. Diese Beobachtung ist schon 1891 von DITTRICH[8] und in neuerer Zeit von BROOKS[9], von MARTINI und SCHULER[10], von OETTEL[11] beschrieben worden und wird im folgenden von uns bestätigt. Nach NEILL und HASTINGS[12] ist die Bildungsgeschwindigkeit von Hämiglobin unabhängig von der Konzentration des Oxyhämoglobins und proportional der Konzentration von Hämoglobin und Sauerstoff. Hämiglobin entsteht in bimolekularer Reaktion direkt aus dem Hämoglobin. Der Vorgang der spontanen Hämiglobinbildung bei Kontakt mit molekularem Sauerstoff erschien uns nicht nur wichtig als Quelle von Versuchsfehlern, sondern vor allem geeignet als Methode zum Studium von Faktoren in der Blutflüssigkeit, die die Blutfarbstoffumwandlung beeinflussen könnten.

Zum Nachweis des Hämiglobins in den verdünnten, hämolysierten Blutlösungen diente uns die Methode von HAVEMANN, JUNG und v. ISSEKUTZ[13]. Aus Gründen einwandfreier Sterilität und unter dem Blickpunkte des Abbaues von menschlichem Hämoglobin kam meist Menschenblut zur Verwendung. Die steril aus der Armvene entnommenen und verdünnten Blutproben wurden bei 37° C im Brutschrank belassen und zu den erforderlichen Zeitpunkten untersucht. Einstellung des gewünschten p_H mit geeigneten Puffern und Kontrolle mit der Chinhydron- oder der Glaselektrode.

Versuchsergebnisse.

A. Der Einfluß des Verdünnungsgrades und der Wasserstoffionenkonzentration auf die Hämiglobinbildung.

Es soll zunächst an 2 Beispielen (Abb. 1) der typische Verlauf einer solchen spontanen Hämiglobinbildung gezeigt werden. Die Reaktion des Blutfarbstoffes mit dem Luftsauerstoff erfolgt bei allen unseren Versuchen in exponentialer Funktion. Nach beschleunigter Anfangsphase wird die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung allmählich geringer, bleibt jedoch über 24 Stunden hinaus noch ansteigend. Für verschiedene Blutproben laufen die Hämiglobinkurven auch bei gleichem Hämoglobinausgangswert nicht immer mit gleicher Bildungsgeschwindigkeit.

Offenbar sind in solchen verdünnten, hämolysierten Blutlösungen noch reduzierende Faktoren, wenn auch abgeschwächt, wirksam, die aus den roten Zellen, vielleicht aber auch aus anderen Quellen stammen. Die abnehmende Bildungsgeschwindigkeit von Hämiglobin ließe sich teilweise auch dadurch erklären, daß

nach KIESE [2] bei zunehmender Konzentration des Hämiglobins seine enzymatische Reduktion zunimmt.

Schon HEUBNER [1] hatte darauf hingewiesen, daß die spontane Hämiglobinbildung in verdünnten Blutlösungen auf einem durch die Verdünnung bedingten Unwirksamwerden von reduzierenden Faktoren der roten Zellen beruhen könnte. So führt die Hämolyse in vitro dazu, daß die Systeme der Hämiglobinreduktion in ihrer Aktivität abgeschwächt und schließlich unwirksam werden. Innerhalb der Wirkungsphase dieser Reduktionssysteme aber muß die Hämoglobinoxydation um so geringer sein, je konzentrierter die hämolysierte Blutlösung ist, d. h. je reicher an reduzierenden Faktoren.

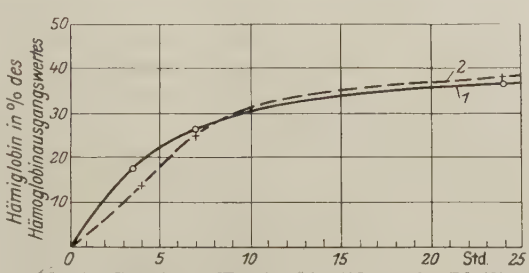


Abb. 1. Spontane Hämiglobinbildung in Blutlösungen aus hämolysierten gewaschenen Menschenerythrozyten. pH-Einstellung durch m/15-Phosphatpuffer. Zwei verschiedene Proben von Menschenblut. 37° C. *1* Hämoglobin = 1,38 g-%, pH 7,35. *2* Hämoglobin = 1,65 g-%, pH 7,08.

Es läßt sich in vitro eine deutliche *Abhängigkeit der Hämiglobinbildung von der Konzentration wasserhämolysierter Blutlösungen nachweisen.* Aus Abb. 2 ergibt sich, daß von einer bestimmten Verdünnungsgröße an die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung stark ansteigt, unterhalb derselben abnimmt. Die Grenze liegt für verschiedene Blutproben natürlich nicht an gleicher Stelle, sondern besitzt jene Streuung, die sich wahrscheinlich aus der verschiedenen Konzentration und Qualität noch anwesender reduzierender Systeme ergibt. Für unsere Beispiele, die verdünntes hämolysiertes Zitratblut bzw. defibriniertes Blut betreffen, liegt die Konzentrationsgrenze etwa bei 2% Hämoglobin.

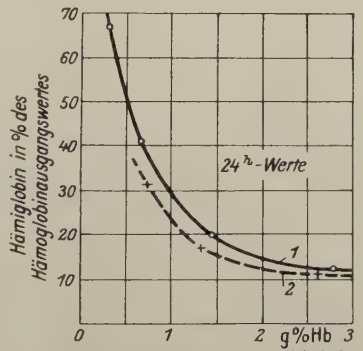


Abb. 2. Spontane Hämiglobinbildung in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrade. Zwei verschiedene Proben von Menschenblut. 24-Stundenwerte. 37° C. *1* Zitratblut hämolysiert. *2* Defibriniertes Blut hämolysiert.

Ein Bild von dem Einfluß des Verdünnungsgrades der in den Erythrozyten eingeschlossenen Reduktionssysteme auf die spontane Hämiglobinbildung vermittelten uns besonders die 20-Stundenwerte der Abb. 3. Es wurden 5 verschiedene Konzentrationsreihen aus 5 innerhalb eines Monats (November/Dezember) erfolgten Blutentnahmen vom gleichen Spender untersucht. Die Hämiglobinlösungen wurden durch Wasserhämolyse der gewaschenen Erythrozyten zubereitet. Jede der 5 Konzentrationsreihen unterscheidet sich etwas von den anderen in

der Lage ihrer Hämiglobinbildungskurve, aus jeder einzelnen geht jedoch die Abhängigkeit von dem Verdünnungsgrade deutlich hervor. Die Gesamtbetrachtung der so streuenden Einzelkurven vermittelt das Bild einer Durchschnittskurve der spontanen Hämiglobinbildung für den betreffenden Spender innerhalb des gewählten Monats.

Bei den sonstigen Versuchen mit Konzentrationsreihen hatten wir den Eindruck, daß auch von Person zu Person und von Fall zu Fall erhebliche Unterschiede in der Lage der Verdünnungskurve im Koordinatensystem auftreten. Die dadurch zum Ausdruck kommenden Unterschiede im Gehalte der roten Zellen an Reduktionssystemen stehen wahrscheinlich in Abhängigkeit von dem verschiedenen Grade der glykolytischen Vorgänge in den Erythrozyten und mögen wohl auch für die verschiedenen Tage und Jahreszeiten von der jeweiligen Stoffwechsellage her beeinflußt sein.

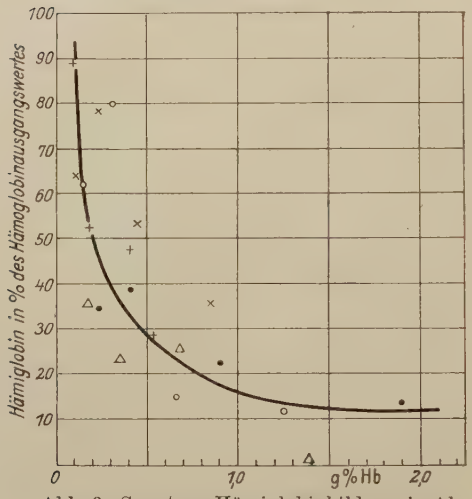


Abb. 3. Spontane Hämiglobinbildung in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrade hämolysierter, gewaschener Erythrozyten. Menschenblut. Fünf verschiedene, innerhalb eines Monats (November/Dezember) entnommene Blutproben des gleichen Spenders. p_H-Werte zwischen 7,2—7,3. 20-Stundenwerte. 37° C.

Bemerkenswert ist die *Abhängigkeit der spontanen Hämiglobinbildung von der Wasserstoffionenkonzentration* (Abb. 4). Die Geschwindigkeiten sinken rasch mit steigendem p_H. Sie verhalten sich bei verschiedenen Blutproben durchaus nicht gleichartig, wohl entsprechend der wechselnden Menge von Katalysatoren. Die Hämiglobinbildung besitzt um die Gegend des Blut-p_H-wertes eine Minimalzone, teilweise auch ein regelrechtes Pessimum. In diesem Bereiche und im weiter alkalischen Gebiete ist die Geschwindigkeit der Hämoglobinoxydation nur sehr gering. Von einem p_H-Wert von 5 ab ins weiter saure Gebiet hinein kommt es zu einer Abspaltung der prosthetischen Farbstoffgruppe, des *Hämatins* und zur Säureausflockung des Globinanteiles. Unsere p_H-Abhängigkeit stimmt mit den Befunden von BROOKS[9] überein. Abgesehen von den reduzierenden Faktoren der Erythrozyten selbst, die auch nach Hämolyse noch teilweise wirksam bleiben, ist somit die Hämiglobinbildung im alkalischen Bereiche selbst sehr gering.

B. Der hemmende Einfluß von Blutplasma auf die spontane Hämiglobinbildung.

Zu den reduzierenden enzymatischen Systemen aus der Glykolyse der roten Zellen und dem hemmenden Einfluß des alkalischen p_H-Bereiches

gesellt sich als weiterer Faktor der *hemmende Einfluß des Blutplasmas*. Es muß aber von vornherein darauf hingewiesen werden, daß es sich hier um Versuche in vitro handelt, d. h. auch an die Möglichkeit gedacht werden muß, daß sich solche hemmenden Einflüsse erst im Laufe der Bebrütung bei 37° C entwickeln. Doljanski und Koch [14] beobachteten, daß sich bei steriler Bebrütung von Hämoglobinlösungen mit Serum größere Mengen von Hämiglobin (auch Hämatin) bildeten. Wir glaubten einen Effekt in gleicher Richtung erwarten zu dürfen, als wir Hämoglobinlösungen aus gewaschenen roten Blutkörperchen allein mit solchen aus Nativblut oder nach Zusatz von Zitratplasma verglichen. Die Tabelle 1 gibt für diejenigen Versuche, bei denen das p_H mitgemessen wurde, einen Überblick über die beobachteten Hemmungseffekte und zwar, jeweils nach dem p_H geordnet, bei Hämolyse von Nativblut, von Zitratblut und von gewaschenen Erythrozyten mit nachträglich zugesetztem Zitratplasma, alle im Vergleich zu gewaschenen Erythrozyten allein oder solchem plus Natriumzitrat. Die beobachteten Hemmungen der spontanen Hämiglobinbildung sind in den meisten Fällen nicht immer stark, aber deutlich. Zu berücksichtigen sind für den Grad des Effektes die (nach der Verdünnung) meist nur geringen Konzentrationen von Plasmabestandteilen, weiterhin die Abhängigkeit des Effektes vom p_H und vom Verdünnungsgrade. Die Verdünnung des zugesetzten Zitratplasmas bewegte sich zwischen 2,3 und 25%.

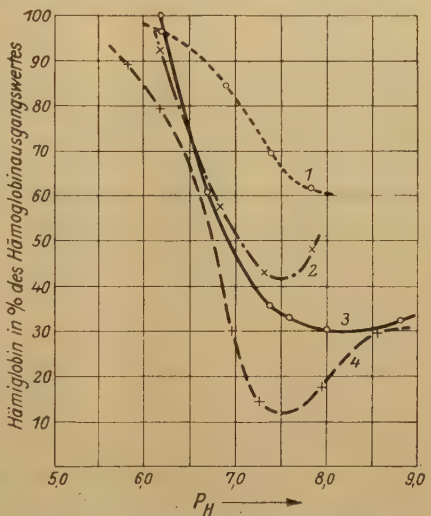


Abb. 1. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die spontane Hämiglobinbildung in verdünnten Blutlösungen. Menschenblut. 37° C. 24-Stundenwerte. *1* Gewaschene Erythrozyten, hämolysiert. Hämoglobin 0,26 g-%. m 30 Phosphatpuffer. *2* Nativblut hämolysiert. Hämoglobin 0,26 g-%. m/30 Phosphatpuffer. Beide Lösungen aus dem gleichen Blute des Spenders Z. hergestellt. *3* Nativblut hämolysiert. Hämoglobin 1,23 g-%. m/20 Phosphatpuffer und n/20 Ammoniumchlorid-n/20 Ammoniakpuffer. Spender B. *4* Gewaschene Erythrozyten hämolysiert. Hämoglobin 0,63 g-%. m/10 Natriumphosphat-m/20 Zitronensäurepuffer. Spender D.

In der Tabelle 1 nicht enthalten sind 5 Versuche an gewaschenen Erythrozyten im Zitratplasma, bei denen das zwischen 7,0—7,5 liegende p_H nur annähernd gemessen wurde, und von denen in 3 Fällen eine Hemmung, in einem eine Förderung und in einem weiteren keine Beeinflussung zustande kam. Der Zitratgehalt war ohne Einfluß. Die Tatsache, daß in wenigen Fällen die Hemmung ausblieb oder eine Förderung (im Sinne von Doljanski und Koch [14]) eintrat, spricht für weitere, interferierende Faktoren.

Tabelle 1.

Nr.	pH	Spontane Hämiglobinbildung in Prozent des Hämoglobinausgangswertes nach Hämolyse und Verdünnung von		Hemmungseffekt als Differenz	Hämoglobinausgangswert	Bebrütungszeit bei 37° C
		gewaschenen Erythrozyten	Nativblut	%	%	in Stunden
		allein				
1	6,09	68,1	68,1	± 0	1,13	23
2	6,18	96,0	88,0	— 8,0	0,26	24
3	6,27	71,0	62,0	— 9,0	0,37	24
4	6,59	79,0	71,0	— 8,0	0,43	24
5	6,67	60,0	52,0	— 8,0	0,37	24
6	6,75	49,5	45,3	— 4,2	1,13	23
7	6,75	56,6	41,6	— 15,0	1,20	24
8	6,86	85,0	57,0	— 28,0	0,26	24
9	7,09	30,0	9,0	— 21,0	0,44	24
10	7,14	60,0	55,5	— 4,5	0,43	24
11	7,22	50,0	37,0	— 13,0	0,37	24
12	7,26	34,5	16,8	— 17,7	1,13	23
13	7,35	69,5	44,0	— 25,5	0,26	24
14	7,43	51,2	46,5	— 4,7	0,43	24
15	7,83	61,5	47,0	— 14,5	0,26	24
			Zitratblut			
16	7,30	80,0	22,2	— 57,8	0,45	24
17	7,30	72,0	20,0	— 52,0	0,90	24
18	7,30	65,0	30,0	— 35,0	0,20	20
		+ Natriumzitrat	Gewaschene Erythrocyten + Zitratplasma			
19	6,72	43,8	38,5	— 5,3	1,14	24
20	6,77	63,5	44,0	— 19,5	1,18	24
21	6,80	55,5	55,5	± 0	0,90	24
22	6,98	67,6	54,1	— 13,5	0,96	24
23	7,05	59,5	30,9	— 28,6	0,84	24
24	7,25	30,0	8,0	— 22,0	0,20	18

Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die durch Plasma bedingte Hemmung geht aus den Kurven 1 und 2 der Abb. 4 hervor. Beide entstammen zu gleicher Zeit aus dem Blute desselben Spenders. Nach 24 Stunden ist der prozentuale Hemmungseffekt im verdünnten Nativblute (*2*) gegenüber verdünnten gewaschenen Erythrozyten allein (*1*) deutlich erkennbar. Mit zunehmender Azidität nimmt er immer mehr ab, um bei einem p_H-Wert von etwa 6,0 zu verschwinden. Am stärksten ist er ausgeprägt im Gebiete des physiologischen Blut-p_H. Nach 48 Stunden konnte der Hemmungseffekt nicht mehr nachgewiesen werden, beide Kurven deckten sich völlig, ein Hinweis darauf, daß es sich um Hemmungsfaktoren handeln muß, die bei längerem Stehen zugrunde gehen oder aufgebraucht werden. Die Unbeständigkeit der in vitro-Faktoren des Blutplasmas spricht andererseits gegen ihr

nachträgliches Entstehen und für ihr ursprüngliches Vorhandensein im strömenden Nativblut selbst.

Unsere Mutmaßung über das Wesen der Hemmungsfaktoren im Blutplasma mußte verschiedene Möglichkeiten berücksichtigen. Außer den Gärungsprodukten und den daran beteiligten Fermenten könnten u. a. als reduzierende Substanzen in Frage kommen: Cystein, Askorbinsäure, Glutathion, Harnsäure und Kreatinin. Unsere eigene Vermutung richtete sich zunächst auf glykolytische Prozesse, die in vitro in Gang gesetzt werden könnten.

Hinsichtlich der Abbauprodukte der Glykolyse weisen wir auf die Ergebnisse von Kiese [2, 3, 4] hin. Dieser stellte an Erythrozytensuspensionen in Phosphatringer bzw. Serum, deren Blutfarbstoff in Hämiglobin überführt worden war, eine Steigerung der Hämiglobinreduktion durch Glukose und deren erste Abbauprodukte, sowie durch Milchsäure fest. Durch Zusatz von Monojodazetat oder Natriumfluorid konnte er eine partielle Aufhebung der Glukosewirkung erreichen, desgleichen durch Brenztraubensäure und Malonsäure eine Hemmung der Milchsäurewirkung. Nach Hämolyse waren weder Fruktose noch Glukose in der Lage, Hämiglobin zu reduzieren, jedoch Robisonester und Hexosediphosphat. Der gewählte Hämolysegrad (4fache Verdünnung) gewährleistete wohl noch eine genügend hohe Konzentration reduzierender, aus den Erythrozyten stammender Systeme.

Wir prüften selbst in einer Reihe von Versuchen an menschlichen Blutlösungen den Einfluß von Glukose (0,1%), Hexosediphosphat (0,1%) und Milchsäure (0,1 mol), ebenso der Glykolyseinhibitoren Natriumfluorid (0,01 mol) und Monojodazetat (0,01 mol), schließlich auch der Hemmungsstoffe des Milchsäure-Milchsäuredehydrasesystems Pyruvinat (0,05 mol) und Malonsäure (0,013 mol) (letztere auch an Kaninchenblutlösungen). Nur in einigen unserer Versuche bewirkte Glukose eine Verstärkung der Plasmahemmung, in den meisten Fällen jedoch nicht. Hexosediphosphat, Milchsäure und alle erwähnten Inhibitoren veränderten den Plasmaeffekt nicht. So konnten wir glykolytische Ursachen für die Plasmahemmung nicht verantwortlich machen. Aber auch mit Askorbinsäure ($1{,}4 \cdot 10^{-3}$ mol) und Cystein ($2{,}5 \cdot 10^{-3}$ mol) ließ sich der Plasmaeffekt nicht beeinflussen.

Für die beiden letzten Stoffe wurde von Kiese eine reduzierende Wirkung auf Hämiglobinlösungen, also in vitro nachgewiesen, und zwar durch Konzentrationen, wie sie auch physiologisch vorkommen. Er glaubt sie für die Reduktion des Hämiglobins in den roten Zellen selbst ausschließen zu dürfen, da sie in dieselben nicht eindringen können, und weil im übrigen bei ihrer Tätigkeit auch Verdoglobin A nachweisbar sein müßte. Die Beobachtung, daß in unseren Versuchen Askorbinsäure in vitro den Plasmaeffekt nicht aufzuheben vermochte, spricht für eine andere Ursache desselben.

C. Der fördernde Einfluß von Serum und Mellanby-*Thrombin auf die spontane Hämiglobinbildung.*

Unsere Befunde mit Zitratblut sowie Zitratplasma führten uns zur Vermutung, daß der Grund in den Unterschieden zwischen Plasma

und Serum zu suchen sei. DOLJANSKI und KOCH[4] hatten darauf hingewiesen, daß beim Zusammenbringen einer Blutfarbstofflösung mit Serum das Hämoglobin weitgehend verändert wird. Unter allmählichem Verschwinden des Oxyhämoglobinspektrums traten innerhalb einiger Tage zunehmend erhebliche Mengen Hämiglobin und als Zeichen einer Zerstörung des Hämoglobinmoleküls auch Hämatin auf.

Das Ausbleiben dieser Förderung der spontanen Hämiglobinbildung ließ sich zunächst durch Versuche belegen, wie sie in dem Beispiel der Abb. 5 dargestellt sind. Gegenüber einer Blutlösung aus gewaschenen Erythrozyten allein war in einer solchen mit *Serumzusatz* nach 24 Stunden eine deutliche Förderung, in einer hämolysierten Nativblutlösung dagegen unsere früher erwähnte Hemmung nachweisbar. (Alle Blutfarbstofflösungen wurden aus dem gleichen Spenderblut hergestellt.) Der fördernde Serumeffekt wäre aber wohl verborgen geblieben, wenn wir ihn nicht in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration eingestellt hätten. Gerade beim physiologischen Blut-p_H fehlt er völlig, und weiter im alkalischen Bereich unterschneidet die Serumkurve sogar die Kurve der Blutlösung aus gewaschenen Erythrozyten allein. Umgekehrt nimmt der Serumeffekt mit steigender Azidität zu. Nach 40 Stunden war der hemmende Nativbluteffekt verschwunden, der fördernde Serumeffekt geblieben. Es mußte sich im Serum also um einen Faktor handeln, der stabiler war als die hemmenden Nativblutfaktoren. Durch 1stündiges Erhitzen auf 56° C ließ sich Serum hinsichtlich seines Förderungseffektes völlig inaktivieren, wie aus Abb. 5 hervorgeht. Nach 48 Stunden war jedoch auch in den Proben mit inaktiviertem Serum eine gesteigerte Hämiglobinbildung nachweisbar, wenn auch geringer als mit unbehandeltem Serum, ein Beweis, daß der Inaktivierungseffekt teilweise wieder verschwunden war. Das rasche Absinken der Serumwirkung nach dem physiologischen p_H-Bereiche des Blutes hin erklärte uns auch die Erscheinung, daß wir nur in einem Teil unserer sonstigen Versuche zwischen p_H 7,0—7,5 eine Förderung der spontanen Hämiglobinbildung nachweisen konnten. Nach Zusatz von 1—50% Serum zu verschiedenen Hämoglobinkonzentrationen war 7mal eine Förderung, 5mal eine Hemmung, 3mal keine Beeinflussung festzustellen.

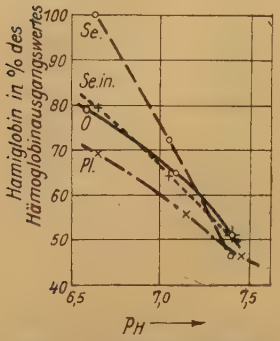


Abb. 5. Spontane Hämiglobinbildung nach 24 Stunden in Blutlösungen aus Menschenblut bei verschiedenem p_H. Hämiglobin 0,44 g-%. 37° C. Phosphatpuffergehalt: m/30. Alle Lösungen wurden aus der gleichen Blutprobe hergestellt. *O*: nach Hämolyse von gewaschenen Erythrozyten, *Pl.*: von Nativblut, *Se.*: von gewaschenen Erythrozyten + 4% Serum. *Se. in.*: wie *Se.*, jedoch nach Seruminaktivierung (1 Stunde bei 56° C).

Serum verliert bekanntlich seine Gerinnungsaktivität beim Stehen durch Inaktivierung des Thrombins zu inaktivem Metathrombin. Damit fiel unsere Vermutung auf Veränderungen durch den eingetretenen Gerinnungsvorgang.

Wir setzten unseren Blutfarbstofflösungen *Thrombinlösungen* und *-pulver* nach MELLANBY [15] und BLEIBTREU [16] hinzu. In Abb. 6 sind zwei solche Versuche mit Thrombinlösungen enthalten. Die Möglichkeit, höhere Thrombinkonzentrationen zuzusetzen, als sie im Serum vorkommen, ließ den fördernden Effekt auch im alkalischen Bereiche, je nach der Gerinnungsaktivität, deutlich erkennbar werden, zumal Thrombin, je reiner es vorliegt, um so stabiler ist. Eine 1—2stündige Erwärmung solcher Thrombinlösungen auf 60 bis 70° C vermochte den fördernden Thrombineffekt nur wenig zu beeinflussen. Auch konnte man manchmal aus dem Verlauf der Kurve mit „inaktivierter" Thrombinlösung auf eine Reaktivierung schließen. Thrombinlösung verhält sich also nicht nur bezüglich der Gerinnungsaktivität, sondern auch bezüglich der spontanen Hämiglobinbildung hitzestabiler als Serum. In mehreren Versuchen konnten wir weiter feststellen, daß die Hämiglobinwerte nach 24 Stunden oder länger wieder abgesunken waren. Wir wollen versuchen, diese Tatsache später zu deuten. Bei 8 Versuchen mit Thrombinlösungen bei einem p_H 6,5 und 7,45 und Hämoglobinkonzentrationen zwischen 1,13—2,38% erlebten wir in 7 Fällen eine Förderung und in 1 Fall ein Ausbleiben derselben. Der fördernde Thrombineffekt war meistens schon nach wenigen Stunden mit bloßem Auge zu erkennen.

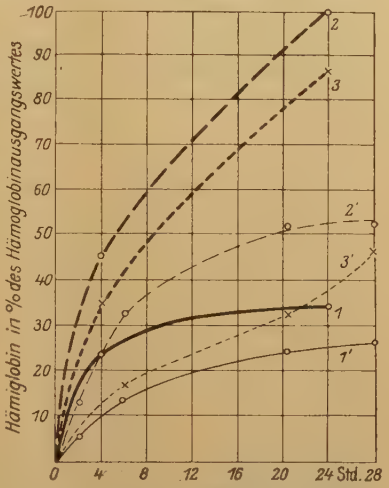


Abb. 6. Spontane Hämiglobinbildung in Blutlösungen aus Menschenblut nach Zusatz von Thrombinlösung (aus Rinderblut nach MELLANBY und BLEIBTREU). Zwei Versuchsbeispiele: *1, 2, 3*: Hämoglobin 1,41 g-%. p_H 6,7. *1', 2', 3'*,: Hämoglobin 1,86 g-%. p_H 6,8. *1*(bzw. *1'*): Hämoglobinlösung aus gewaschenen Erythrozyten, *2* (bzw. *2'*): aus gewaschenen Erythrozyten + Thrombinlösung (bei *2*: auf 4 Teile Hämoglobinlösung 1 Teil, bei *2'*: nur 0,9 Teile Thrombinlösung). *3* (bzw. *3'*): wie *2* (bzw. *2'*), jedoch nach Inaktivierung der Thrombinlösungen (1 Stunde bei 60° C). Gerinnungsaktivität (in Sekunden bis zum Eintritt der Gerinnung) der Thrombinlösung in Versuch *1, 2, 3*: 8 Sek., in Versuch *1', 2', 3'*: 20 Sek.

Die Abhängigkeit der Wirkung der MELLANBY-*Thrombinlösung von der Wasserstoffionenkonzentration* ist aus Abb. 7 ersichtlich, und zwar schon nach 4 Stunden Einwirkungsdauer. Wie beim Serumzusatz besitzt auch die Thrombinlösung ihre stärkste Wirksamkeit im zunehmend

sauren Gebiete. Auch die Unterscheidungstendenz im Bereich des physiologischen Blut-p_H ist erkennbar. Serum und Thrombin verhalten sich also so gleichartig, daß an der Identität des fördernden Serumfaktors mit dem in der MELLANBY-Thrombinlösung nicht gezweifelt werden kann.

Die *quantitative Beziehung des fördernden Thrombineffektes zur Thrombinmenge* ließ sich auch an einem Thrombinpulver zeigen, das wir ebenfalls nach der Vorschrift von MELLANBY und BLEIBTREU herstellten (Abb. 8). Die Gerinnungsaktivität dieses Präparates war aller-

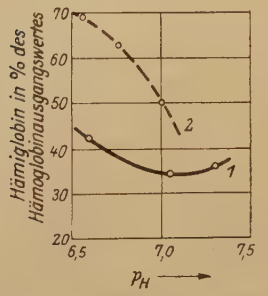


Abb. 7. pH-Abhängigkeit der Wirkung einer Thrombinlösung (MELLANBY und BLEIBTREU) auf die spontane Hämiglobinbildung nach 4 Stunden in Menschenblutlösungen. 37° C, Hämoglobin 1,38 g-%, Phosphatpuffergehalt m/40. *1* Nach Hämolyse von gewaschenen Erythrozyten. *2* Von gewaschenen Erythrozyten und Thrombinlösung (0,45 Teile auf 4 Teile Hämoglobinlösung). Gerinnungsaktivität: 8 Sek.

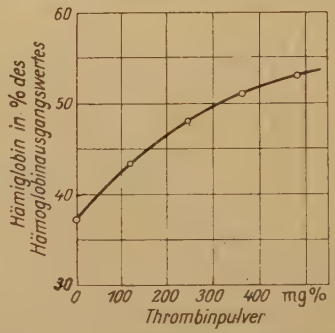


Abb. 8. Spontane Hämiglobinbildung nach 24 Stunden in Abhängigkeit von der Menge Thrombinpulver (MELLANBY und BLEIBTREU). Gerinnungsaktivität (24 mg Trombinpulver + 1 cm³ Menschenzitratplasma): 30 Sekunden. Blutlösungen aus Menschenblut. 37° C. Hämoglobin 0,94 g-%, pH 6,6, Phosphatpuffergehalt m/40.

dings wesentlich geringer als die aller unserer Thrombinlösungen. Der Unterschneidungspunkt dieses Pulvers in einer p_H-Abhängigkeitskurve, die ähnlich der Kurve in Abb. 6 angelegt wurde, verschob sich dabei etwas unter den Neutralpunkt auf $p_H = 6{,}8$, ein Verhalten, das wohl auf die immerhin eingreifenden Veränderungen bei der Herstellung des Thrombinpräparates zurückzuführen ist.

Besprechung.

Im Zusammenhang mit dem intra- oder extravasalen Erythrozytenzerfall wird auch das Schicksal des durch die Hämolyse freigewordenen Hämoglobins erörtert (MASSHOFF[17], ASCHOFF[18]). Der Blutfarbstoffabbau in der Blutbahn läßt sich grundsätzlich nicht verneinen. Unter physiologischen Verhältnissen finden wir aber bei Abbauprozessen nicht wie in vitro Hämatin. Wird gesunden Personen Hämoglobin in die Blutbahn injiziert, so tritt Bilirubin, niemals aber Hämatin auf (DUESBERG).

Das ist an sich kein Beweis gegen die Möglichkeit, daß der Hämoglobinabbau sich nicht doch über das Hämatin vollziehen könnte. Dessen anfallende Mengen könnten ja wegen ihrer geringen Größe als Zwischenprodukt nicht faßbar sein (Schumm [19]). Andererseits sehen wir unter pathologischen Verhältnissen z. B. bei perniziöser Anämie, Malaria, Gasbrand, Hämolyse durch Blutgifte (Schumm [19]), aber auch bei hämolytischem Ikterus (Duesberg [20]), weiterhin bei akuter gelber Leberatrophie (Bingold [21]) und bei Leberzirrhose (v. d. Bergh und Kamerling [22]) nicht selten eine Hämatinämie, gelegentlich sogar einen Hämatinikterus auftreten. Weil Duesberg [20] nach Hämatininjektionen am Menschen keine Bilirubinvermehrung beobachtete, glaubte er, daß auch das bei gestörter Leberfunktion auftretende Hämatin nicht in Bilirubin übergehen könnte. Andere Autoren kamen zu entgegengesetzten Ergebnissen. So fanden Brugh und v. d. Velde [23] einen Übergang von Hämatin in Bilirubin. Im ganzen bleibt also die Frage nach der Stellung des Hämatins im Blutfarbstoff offen und die Ansicht erscheint noch verfrüht, daß das Hämatin „eine pathologische Sackgasse im Hämoglobinabbau" darstelle. Das Schicksal des Hämatins ist vorläufig noch unbekannt. Wenn man aber eine Bilirubinbildung nur durch Angriff an dem ganzen Hämoglobinmolekül für wahrscheinlich hält, *könnte auch Hämiglobin als passendes Zwischenprodukt möglich sein*, da es einerseits sowohl Hämatin als prosthetische Gruppe enthält, andererseits noch das ganze Farbstoffglobin darstellt. Jedenfalls hat Schumm bei seinen Untersuchungen im Serum eine gewisse Reihenfolge festgestellt, indem bei der ersten Blutentnahme das Oxyhämoglobin oder Hämiglobin, bei der folgenden das Hämatin, und nach einigen weiteren Tagen das Bilirubin überwog, schließlich dieses nur noch allein vorhanden war. Wesentlich ist vor allem, daß bei vermehrtem Blutzerfall zuerst auch Hämiglobin auftrat. Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkte den Blutfarbstoffabbau, dann wäre Hämiglobin als erstes Umwandlungsprodukt denkbar. In den roten Zellen ist der weitere Abbau infolge der reduzierenden Systeme nicht möglich, wohl aber im Gewebe.

Wie steht es nun nach unseren Ergebnissen mit den Bedingungen im Plasma und Serum? Über die späteren Abbaustufen des Blutfarbstoffs können wir nichts aussagen, vielleicht aber über die Faktoren für die Bildung von Hämiglobin. Nach unseren Versuchen an Blutlösungen müssen wir unter physiologischen Verhältnissen die *Bedingungen für eine Hämiglobinbildung im Blutplasma für recht ungünstig* ansehen. Es kommen dabei verschiedenartige Einflüsse in Betracht:

Bei massiver Hämolyse üben sicherlich noch die *aus den Erythrozyten frei gewordenen, glykolytischen Reduktionssysteme* eine hemmende Wirkung auf die Umwandlung des Blutfarbstoffs in Hämiglobin aus. Diese

Enzymsubstratsysteme der Gärung der roten Zellen sind nach Art und Wirkungsweise schon weitgehend aufgeklärt worden (HEUBNER [1] und Mitarbeiter [2, 3, 4]).

Der *schwach alkalische p_H-Wert des Blutes bietet einen wirksamen Schutz für das Hämoglobin*, da die Oxydation zu Hämiglobin in diesem Bereich nur eine minimale Geschwindigkeit aufweist. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration in diesem Zusammenhang ist somit sehr groß, zumal es Körpergewebe und -flüssigkeiten gibt, deren p_H-Werte deutlich von der Blutreaktion abweichen können. Im sauren Urin ist die Hämiglobinbildung bekannt. Wie liegen aber die Verhältnisse im arbeitenden Muskel? Hier treffen wir nach ROUS [24] sowie FISKE und SUBBAROW [25] auf p_H-Verschiebungen bis zu 5,6 herab. Die Bedingungen für die Stabilisierung des Muskelhämoglobins sind bei der größeren Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung im sauren Bereiche ungünstiger als im schwach alkalischen Blutmilieu. Trotzdem kommt es durch reduzierende Vorgänge, die denen im Erythrozyten ähnlich sind (KIESE [2]), nicht zu einer Anhäufung von Muskelhämiglobin in vivo. Ob nicht gerade hier die reichlich anfallende Milchsäure im Zusammenwirken mit der entsprechenden Milchsäuredehydrase eine besondere sinnvolle Rolle als Reduktionssystem spielen könnte?

Es läßt sich in vitro eine *zusätzliche, hemmende Wirkung des Plasmas* nachweisen, die die Hämoglobinoxydation verzögert, und die man wahrscheinlich auch für die Bedingungen in vivo annehmen darf. Ihre optimalen Bedingungen besitzt sie bei der alkalischen Blutreaktion, was ein besonders günstiges Zusammenwirken mit dem durch den p_H-Einfluß des Blutes schon allein bedingten Minimum der Hämiglobinbildung zur Folge hat. Welcher Natur diese zusätzlichen Hemmungsfaktoren sind, konnten wir aus unseren bisherigen Versuchen nicht feststellen. Bei aller Vorsicht in der Übertragung von in vitro-Befunden auf die Verhältnisse im Gesamtorganismus sprechen somit eine Reihe von Faktoren für die Annahme, daß die Umwandlung von Hämoglobin in Hämiglobin im Blutstrom weniger günstige Bedingungen antrifft als in der Milz bzw. in den Geweben. Demgegenüber stehen die bekannten fördernden Wirkungen von sterilem Gewebe, Organextrakten und -filtraten auf die Hämiglobinbildung in vitro bei steriler Bebrütung, die von einer Reihe von Untersuchern erhoben wurden (s. bei DOLJANSKI und KOCH [14]).

Es kann als sinnvoll angesehen werden, daß der Blutfarbstoff im Nativplasma Bedingungen der Stabilisierung und im Serum Möglichkeiten zu seinem stufenweisen Abbau vorfindet. Zur Serumbildung kommt es aber erst nach Eintritt der Gerinnung, z. B. nach Blutaustritten ins Gewebe. Hier können die *hämiglobinfördernden Faktoren*

des Serums mit den proteolytischen Fermenten aus den Gewebszellen und Leukozyten zusammen wirken. Im Gegensatz zum physiologischen p_H-Wert des strömenden Blutes bietet die p_H-Verschiebung im arbeitenden Muskel die Möglichkeit, mit dem Serumfaktor verstärkend zusammen zu wirken. Beide Bedingungen führen zu einer Erhöhung der spontanen Umwandlung des austretenden Blutfarbstoffs in Hämiglobin.

Die Versuche mit zugesetztem Mellanby-*Thrombin* weisen darauf hin, daß es sich bei dem in Frage kommenden Serumfaktor um das Thrombin handeln könnte. Es läßt sich insbesondere auch die gleiche Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration einstellen. Wir müssen hier allerdings den Vorbehalt machen, daß das Thrombin noch nicht völlig rein dargestellt werden kann, andererseits bekanntlich alle Thrombinpräparate eine mehr oder minder starke fibrinolytische Wirkung entfalten, die wahrscheinlich auf einer Verunreinigung der Präparate mit einem tryptischen Ferment (Fibrinolysin) beruht. Thrombin könnte somit, bei aller Bedeutung sonstiger Abbaubedingungen als mitwirkender Faktor bei dem Abbau des Blutfarbstoffs in Blutergüssen angesehen werden. Wie Doljanski und Koch[14] zeigen konnten, tritt nach Serumzusatz zu Blutlösungen neben Hämiglobin auch Hämatin auf. Wir selbst können das nachträgliche Verschwinden bedeutender Hämiglobinmengen in unseren mit Thrombin versetzten Blutlösungen nur in demselben Sinne deuten, zumal wir auch bei der spektroskopischen Prüfung nach Stunden einwandfrei Hämatin nachweisen konnten. Hämiglobin ist also tatsächlich die erste Stufe des Blutfarbstoffabbaus.

Unklar bleibt vorläufig der Angriffspunkt des Thrombins. Die Bildung von Hämiglobin scheint zunächst auf eine reine Veränderung am Eisen hinzuweisen. Das spätere Auftreten von Hämatin erinnert andererseits an die auch durch Säuren auftretende Hämatinbildung. Es beweist die Abspaltung des Globinanteiles. Die Erhaltung der Verbindung zwischen der Farbstoffgruppe und dem Globinanteil ist eine der Voraussetzungen für die Stabilität des Hämoglobins. Nach Abspaltung des Globins durch Säure oxydiert die Ferrofarbstoffgruppe zur Ferristufe. Es ergibt sich die Frage, ob (ähnlich wie bei den Säuren) die Hämatinbildung durch Thrombin durch eine regelrechte Abspaltung des Globins, die Hämiglobinbildung dagegen durch eine schwache Wirkung auf das Globin, eine Denaturierung, zustande kommt. Diese Vermutung kann aber erst dann als bewiesen gelten, wenn die Veränderungen des Globinanteiles direkt nachgewiesen werden können. Hierbei ergeben sich durch die Instabilität der immer (auch in gut gereinigter Form) eiweißhaltigen Thrombinpräparate noch erhebliche Schwierigkeiten.

Zusammenfassung.

An dem Vorgang der exponential verlaufenden, spontanen Hämiglobinbildung in verdünnten, durch Wasser hämolysierten Blutlösungen

wurde der Einfluß des Verdünnungsgrades, der Wasserstoffionenkonzentration, des Plasmas, des Serums und des Thrombins (nach Mellanby und Bleibtreu) untersucht. Die Messung der Hämiglobinzunahmen erfolgte nach der Cyanidmethode von Havemann, Jung und von Issekutz.

In konzentrierten Blutlösungen ist die spontane Hämiglobinbildung gering, mit steigender Verdünnung nimmt sie rasch zu, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Gehalte der nach Hämolyse noch wirksamen, reduzierenden, glykolytischen Substrat-Fermentsysteme aus den roten Zellen. Die Lage einer solchen Hämoglobinbildungskurve in einer Verdünnungsreihe wechselt nach Person und Zeit, woraus man auf einen wechselnden Gehalt an reduzierenden Systemen schließen kann.

Die spontane Hämiglobinbildung in vitro steht in deutlicher Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Die hohe Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung im sauren Bereiche sinkt in der Gegend des Neutralpunktes auf ein Minimum herab. Beim physiologischen Blut-p_H ist sie nur sehr gering.

Das Blutplasma (Nativ- und Zitrat-) besitzt zusätzlich einen allmählich verschwindenden Hemmungseffekt auf die Hämiglobinbildung. Aus den vorliegenden Versuchen konnte ein Faktor aus dem Vorgang der Blutglykolyse dafür nicht verantwortlich gemacht werden.

Im Gegensatz zu Plasma bewirkt der Zusatz von Serum eine Zunahme der spontanen Hämiglobinbildung. Der fördernde Serumeffekt ist p_H-abhängig, indem er nach dem sauren Bereiche zunimmt, nach dem physiologischen Blut-p_H hin absinkt bzw. unterschneidet. Eine 1—2stündige „Inaktivierung" bei 60—70° C läßt die fördernde Serumwirkung verschwinden. Plasma und Serum zeigen also einen entgegengesetzten Einfluß auf den Vorgang der spontanen Hämiglobinbildung.

Thrombinlösungen und -pulver nach Mellanby und Bleibtreu führen zu dem gleichen Effekt und besitzen die gleiche p_H-Abhängigkeit wie Serum; es besteht auch eine Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration. Die „Inaktivierung" hat nur eine partielle Abnahme der fördernden Wirkung zur Folge. Serumfaktor und Mellanby-Thrombin sind als identisch anzusehen.

Literatur.

[1] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — [2] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1946**, 81. — Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 288, 451 (1947). — [3] Kiese, M. u. B. Weis: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **202**, 493 (1943). — [4] Kiese, M. u. W. Schwartzkopf: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 267 (1947). — [5] Amberson, W. R. and R. Höber: J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) **2**, 202 (1932). — [6] Amberson, W. R., L. Flexner, F. R. Steggerda, A. G. Milder, M. J. Treudler, D. S. Pankratz and E. B. Lang: J. cellul. a.

comp. Physiol. (Am.) **5**, 359 (1934). — [7] Aubertin, E., A. Lacoste et R. Castagnou: C. r. Soc. Biol. **132**, 129 (1939). — [8] Dittrich, P.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **29**, 247 (1891). — [9] Brooks, J.: Proc. roy. Soc., Lond. B **109**, 35 (1931). — [10] Martini, P. u. B. Schuler: Z. exper. Med. **83**, 211 (1932). — [11] Oettel, J.: Nach W. Heubner: Erg. Physiol. **43**, 18 (1940). — [12] Neill and Hastings: J. biol. Chem. (Am.) **63**, 471 (1925). — [13] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [14] Doljanski, L. u. O. Koch: Virchows Arch. **291**, 401 (1933). — [15] Mellanby, J.: J. Physiol. (Brit.) **38**, 28 (1909). — [16] Bleibtreu, M.: Pflügers Arch. **213**, 642 (1926). — [17] Masshoff, W.: Dtsch. med. Wschr. **1946**, 92. — [18] Aschoff, L.: Klin. Wschr. **1932**, 1620; **1924**, 961. — [19] Schumm, O.: Z. physiol. Chem. **87**, 171 (1913); **97**, 32 (1916). — [20] Duesberg, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **174**, 305 (1934). — [21] Bingold, K.: Fol. haemat. (D.) **42**, 192 (1930). — [22] van de Bergh u. Kamerling: Ndld. Tschr. Geneesk. **78**, 4432 (1934). — [23] Brugh u. van de Velde: Zit. nach Handbuch der inneren Medizin von G. v. Bergmann, R. Staehelin u. V. Salle, Bd. II, S. 52. Berlin: Springer 1942. — [24] Rous, P.: J. exper. Med. (Am.) **41**, 379, 451, 739. — [25] Fiske and Subbarow: J. biol. Chem. (Am.) **81**, 629 (1929).

Aus dem Instituto de Biologia y Medicina Experimental, Buenos Aires
(Direktor: Prof. Dr. B. A. Houssay).

Über den Mechanismus der Coffeinhyperglykämie.

Von

S. Buchs,

Stipendiat der Schweizerischen Medizinischen Akademie.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. April 1948.)

Die diuretische Wirkung des Coffeins ist seit Jahrzehnten bekannt. 1895 berichtete Jakoby, daß er bei mit Rüben aufgefütterten Kaninchen damit vergesellschaftet auch eine starke Glykosurie beobachtet habe. Denselben Effekt hatte auch Diuretin. Da Dauer und Intensität von Diurese und Zuckerausscheidung einander annähernd parallel gingen, folgerte er, daß auch die Glykosurie primär renalen Ursprungs sei, und daß es sich um einen echten Nierendiabetes handle. Dieser Ansicht widersprach Richter (1898) und verlegte den Angriffspunkt des Diuretins in die Leber, weil diese während des Versuches an Glykogen verarme, ebenso Rose (1902), weil die Hyperglykämie der Glykosurie vorausgehe. Allerdings läßt Rose daneben noch eine renale Komponente gelten. Bang (1914) ist die Reproduktion dieser Versuche mißlungen, weshalb er sie der Erzeugung einer emotionellen Adrenalinhyperglykämie gleichsetzt. Er steht mit dieser Ansicht aber alleine da. Stenström hat 1913 im Institut von Bang selbst den zeitlichen Ablauf der Blutzuckersteigerung genauer kontrolliert, und als erster (und bisher einziger) Kurven bis zu 7stündiger Dauer aufgenommen. Außerdem hat er dabei Coffein und Diuretin getrennt untersucht und festgestellt, daß die Kurven größtenteils zweigipflig verlaufen (s. Abb. 1). Er ist auf diese Eigentümlichkeit aber nicht weiter eingegangen. Er sah den ersten Gipfel als für Coffein oder Diuretin typisch an, und machte für den zweiten Konvulsionen seiner Kaninchen verantwortlich, an denen einige von ihnen gestorben sind.

Über den Weg, auf dem die Leberzellen erregt werden, ob direkt, ob via Splanchnicus, ob via Nebennieren oder via Splanchnicus-Nebennieren, darüber herrscht auch heute noch keine Klarheit. Pollak hat nach doppelseitiger Splanchnicusdurchtrennung keine Glykosurie mehr gefunden und plädiert deshalb für einen Angriff des Diuretins im Zuckerzentrum selbst. Seine Versuche sind aber nicht unbedingt beweiskräftig, da er nur die Urinausscheidung, nicht aber den Blutzucker kontrolliert hat. Bardier, Duchain und Stillmunkes haben

nämlich gezeigt, daß der Blutzucker beim Kaninchen innerhalb dreier Stunden von 164 auf 344 mg-% ansteigen kann, ohne daß Zucker in den Urin übertreten muß.

Nishi hat 1909 seinen Kaninchen die Nebennieren exstirpiert und keinen Blutzuckeranstieg mehr gefunden. Da von der Funktion der Nebennierenrinde zu jener Zeit noch recht wenig bekannt war, war es damals naheliegend, das Nebennierenmark für das Zustandekommen der Blutzuckersteigerung verantwortlich zu machen. Dem widersprachen aber die Befunde von Trendelenburg und Fleischhauer, die das gleichzeitige Auftreten einer Blutdrucksteigerung vermißten. Ebensowenig konnte Miculicich die Hyperglykämie mit Hirudin unterdrücken, was aber der Fall sein müßte, wenn sie durch Adrenalin bedingt wäre. Doppelseitige Splanchnicusdurchtrennung unter Schonung der Fasern, die zur Leber verlaufen, hatte bei Nishi den gleichen Effekt wie die doppelseitige Nebennierenexstirpation. Ja sogar die Durchtrennung des linken N. splanchnicus allein verhinderte bei Nishis Tieren Glykosurie und Hyperglykämie, da dieser Nerv beide Nebennieren versorge.

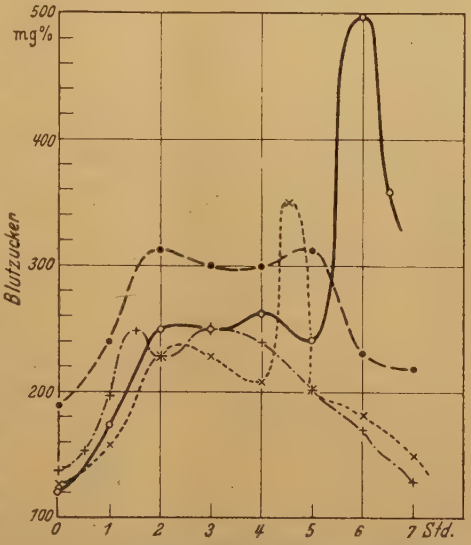


Abb. 1. Blutzuckerkurven nach Coffein und Diuretin bei Kaninchen (nach Stenström).

Die Versuche Nishis konnten das Problem der Lösung nicht sehr viel näher bringen, weil sie von Jarisch zum Teil widerlegt worden sind. Jarischs Tiere reagierten auch nach doppelseitiger Splanchnikotomie auf Diuretin noch regelmäßig mit Hyperglykämie und Glykosurie. Er folgerte daraus, daß Diuretin sowohl zentral, als auch peripher imstande sei, anzugreifen.

Vielleicht sind die Befunde Pfeiffers in der Lage, die Kontroverse Nishi-Jarisch zu lösen. Pfeiffer untersuchte die Nebennieren nach Splanchnicusdurchtrennung histologisch und fand in ihnen die ersten 3 Tage nach der Operation Hyperämie, Blutungen und schlechtere Chromierbarkeit des Markes, sowie Lipoidschwund in der Rinde. Diese Veränderungen sind zwar reversibel, betreffen aber auch nach einseitiger Splanchnikotomie *beide* Nebennieren. Jarisch hat zwar

mit entnervten, aber sonst intakten Nebennieren gearbeitet, da er in seinen Experimenten von der Operation bis zum Versuch 10 Tage verstreichen ließ. Nishi hingegen hat nur 2—3 Tage gewartet, und kam damit über den „Schock"zustand der Nebennieren nicht hinaus. Tatsächlich sind ihm auch die meisten Kaninchen schon bei der Blutentnahme 1—2 Stunden nach der Injektion von Diuretin eingegangen. Das Ausbleiben der Hyperglykämie kann hier ebensogut in einer vorübergehenden Erschöpfung der entnervten Nebennieren liegen wie in einer Unterbrechung der Reizleitung Zuckerzentrum-Nebennieren. Nishis Versuche halten deshalb einer strengen Kritik nicht Stand. Mikami Shozo berichtete nach Splanchnicusdurchtrennung über die gleichen Ergebnisse wie Jarisch.

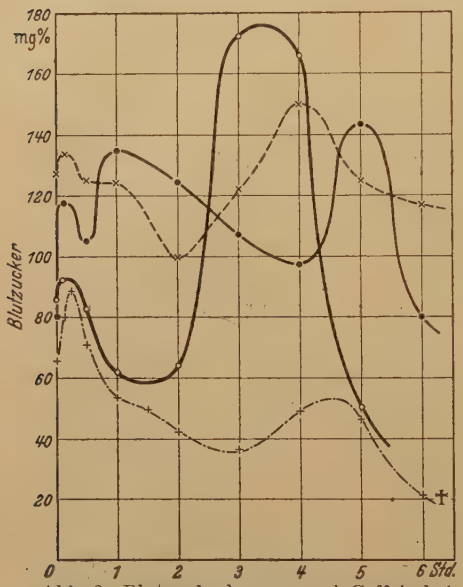


Abb. 2. Blutzuckerkurven nach Coffein bei normalen weißen Ratten (Dosis 50 mg/kg).

Fassen wir diese Übersicht kurz zusammen, so sind nur Hyperglykämie, Glykosurie und Abnahme des Leberglykogens unter Coffein- bzw. Diuretineinwirkung unbestritten. Über den näheren Mechanismus dieser Vorgänge herrscht aber keine Einigkeit.

Wir haben deshalb die entsprechenden Versuche wieder aufgenommen. Als Versuchstiere dienten weiße Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 100—200 g, welche bis 15 Stunden vor Beginn des Versuches die übliche Kost erhalten hatten (Mais, Weizen, Milch, Brot und Vitaminzulagen). Als Präparat wurde Coffeinum purum in Aq. dest. benutzt (1%ige Lösung), und in der Menge von 50 mg/kg Körpergewicht in die Schwanzvene injiziert. Das Procedere bestand in: Nachtpause, Bestimmung des Nüchternblutzuckers aus dem Schwanzblut nach der Methode Hagedorn-Jensen, modifiziert nach Somógyi, intravenöse Injektion der Coffeinlösung und Aufnahme einer Blutzuckerkurve in Abständen von 10 Min., 30 Min., 1, 2, 3, 4, 5 und 6, eventuell auch mehr Stunden. Für jeden Versuch wurden mindestens 3, meist aber mehr Tiere benutzt. Um die Abbildungen nicht zu überlasten, wurden für jedes Experiment nur 3—4 Kurven gezeichnet. Alle Ratten wurden nach Beendigung der Versuche getötet und autoptisch kontrolliert. Als Dosis letalis

min. für intravenöse Applikation wurde in Übereinstimmung mit der Literatur (s. Artikel Bock im Handbuch der experimentellen Pharmakologie) der Wert von etwa 80 mg/kg Körpergewicht gefunden. Die Obduktion dieser Tiere zeigte in einigen Fällen Blutungen in den Nebennieren.

Die Blutzuckerkurve bei normalen Tieren verläuft stets zweigipflig (s. Abb. 2). Der erste Anstieg erfolgt sofort nach der Injektion und kehrt in der zweiten halben Stunde wieder in die Gegend des Ausgangspunktes zurück. Der zweite Anstieg zeigt sich um die 4. Stunde herum (3.—5.) und kann höher, gleich hoch oder niedriger als der erste sein. Die meisten Tiere überlebten, unter 22 Ratten starben nur 2.

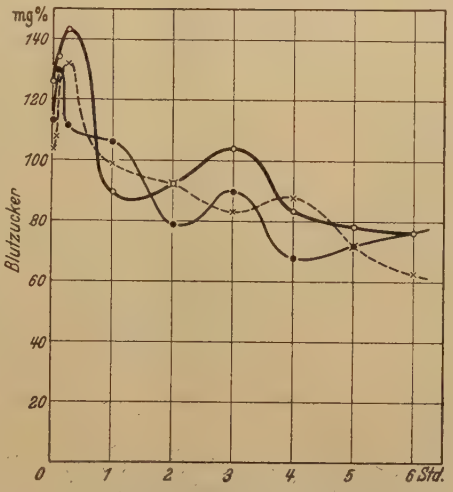


Abb. 3. Blutzuckerkurven nach Coffein bei normalen weißen Ratten (Dosis 20 mg/kg).

Anwendung der halben Dosis Coffein (20 mg/kg) ändert an der Höhe des ersten Blutzuckeranstieges fast nichts, der zweite fällt aber bedeutend niedriger aus (s. Abb. 3). Wir werden auf die Diskrepanz in diesem Verhalten später noch zurückkommen müssen.

Die Temperatur, bei der die Droge injiziert wird (Umgebungstemperatur der Ratte von 18° C oder von 40° C) spielt keine Rolle. Vereinzelte Tiere wurden sofort nach der Injektion von initialen Krämpfen befallen (hingegen nie von Spätkrämpfen wie die Kaninchen Stenströms). Ein Zusammenhang mit bestimmten Veränderungen des Blutzuckers nach oben oder nach unten konnte dabei nicht beobachtet werden. Einige Tiere wurden 40 Stunden nach Beginn des Versuches getötet, zu einem Zeitpunkt, in dem die Zeichen der Alarmreaktion (Selye) am deutlichsten erkennbar sind. Es fanden sich aber keine Anhaltspunkte für diesen Vorgang; es fehlten Ödem der Haut und der inneren Organe, Ergüsse der serösen Häute, Katarakt usw., und das Gewicht der Nebennieren entsprach dem der Kontrollen.

Um die Rolle der Nebennieren in diesen Blutzuckerschwankungen beurteilen zu können, haben wir einer Serie Ratten die Nebennieren vom Rücken her in Äthernarkose entfernt. 8 Tage später wurden sie dann zum Experiment gebraucht. Kontrollen, die nur narkotisiert und scheinoperiert waren (Eröffnung von Haut und Muskulatur, Belassung

der Nebennieren), reagierten wie normale Tiere, wenn sie nicht zu früh verwendet wurden. Die Veränderungen bei den nebennierenlosen Ratten dürfen somit ausschließlich auf das Fehlen der Nebennieren zurückgeführt werden.

Alle nebennierenlosen Tiere starben innerhalb $^1/_2$—2 Stunden nach der Coffeininjektion unter kontinuierlichem Blutzuckerabfall und zum Teil auch hypoglykämischen Krämpfen. Entfernung der Nebennieren erhöht die Empfindlichkeit gegen Coffein so sehr, daß die Kurven für die Dosis von 50 mg/kg und von 5 mg/kg genau gleich ausfallen (s. Abb. 4).

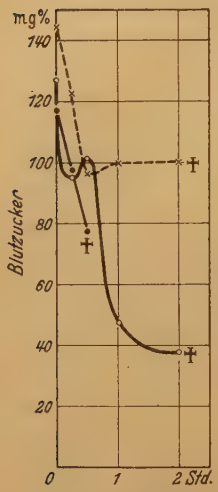


Abb. 4. Blutzukkerkurve nach Coffein bei nebennierenlosen weißen Ratten (Dosis 5(!) mg/kg) eine Woche nach der Operation.

Die Frage, ob das Fehlen der Rinde oder des Markes an dieser Intoleranz die Hauptschuld trage, suchten wir auf folgende Art zu lösen: Einer Anzahl Ratten wurde das Nebennierenmark entfernt (Abkappung eines kleinen Segmentes der Rinde und Auslöffelung des gesamten Markes), einer anderen Reihe wurden die Nebennieren ganz exstirpiert, der Coffeinversuch mit ihnen jedoch erst 6 Wochen später unternommen. Lascano-Gonzalez hat gezeigt, daß bei den Ratten unseres Institutes die akzessorischen Nebennieren in dieser Zeit hypertrophieren, und daß das Mark dabei nicht regeneriert wird. Diese Ratten können somit als reine „Rinden"tiere angesehen werden. Ihre Coffeinkurve unterscheidet sich von der normaler Tiere nur durch den starken Blutzuckerabfall in der ersten halben Stunde, der zweite Gipfel in der 4. Stunde bleibt jedoch überall erhalten (s. Abb. 5 und 6). Außerdem überleben die so präparierten Ratten die Injektion fast ohne Ausnahme.

Aus unseren Versuchen glauben wir den Schluß ziehen zu dürfen, daß der *2. Blutzuckeranstieg nach Coffein über die Nebennierenrinde* geht. Damit stehen auch die Befunde von Miculicich, sowie von Trendelenburg und Fleischhauer in Einklang (s. o.), die es schon vor 35 Jahren abgelehnt haben, die Diuretinhyperglykämie als Ausdruck einer Adrenalinausschüttung anzusehen.

Da bei den Ratten der Abb. 5 und 6 einerseits das Nebennierenmark fehlt, andererseits der erste Blutzuckeranstieg regelmäßig ausbleibt, so ist anzunehmen, daß dieser Gipfel als eine Adrenalinhyperglykämie betrachtet werden darf. Damit nähern wir uns wieder dem Standpunkt von Bang (s. o.). Tatsächlich sind unsere Versuche nicht imstande, eindeutig zu beweisen, ob die erste Phase einer gewöhnlichen, unspezifischen Erregungshyperglykämie gleichzusetzen ist („Fesselungs-

diabetes", Boehm und Hoffmann; Cannon, Shohl, Wright u. a.), als Folge der Injektion und der Manipulationen als solchen, oder aber ob sie einen spezifischen Coffeineffekt darstellt. Injiziert man nämlich Ratten, alle anderen Bedingungen gleichgehalten, Wasser anstatt Coffein, so reagieren sie ebenfalls mit einer primären, oft recht hohen Hyperglykämie. Ja sogar die Blutentnahme allein vermag schon den Blutzucker während der nächsten 10 Min. zu steigern. Der zweite Gipfel bleibt dabei aber immer aus, so daß dessen Erzeugung durch die Droge nicht anfechtbar ist. Watanabe, Sato und Aomura, sowie Satake behaupten zwar, bei Hunden in der 1. Stunde nach Coffein Vermehrung des Adrenalins im Blute gesehen zu haben, welche nach Splanchnicusdurchtrennung sistiere (Watanabe), sie kollidieren damit aber mit den schon mehrfach zitierten Befunden von Miculicich, sowie Trendelenburg und Fleischhauer. Möglicherweise liegt der Grund dieser Gegensätze darin, daß diese zuletzt genannten Forscher mit anderen Tieren gearbeitet haben als die Japaner. Wie dem auch sein mag, so sprechen Abb. 2 und 3 mindestens im Sinne eines verschiedenen Mechanismus für die beiden Blutzuckeranstiege, indem der erste durch Coffeinverminderung kaum, der zweite aber bedeutend stärker erniedrigt wird. Zur Annahme einer unspezifisch und emotionell bedingten primären Hyperglykämie würde dieses Verhalten gut passen. Auch der Typus der ganzen Coffeinkurve entspricht den Eigenschaften, die Zwemer und Sullivan für Adrenalin und Cortin

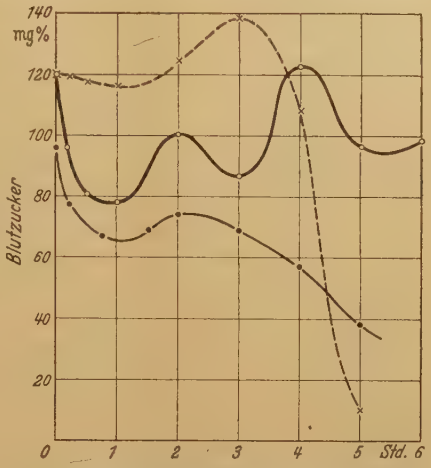


Abb. 5. Blutzuckerkurven nach Coffein (50 mg/kg) bei Ratten, denen das Nebennierenmark ausgelöffelt wurde (2 Wochen nach der Operation).

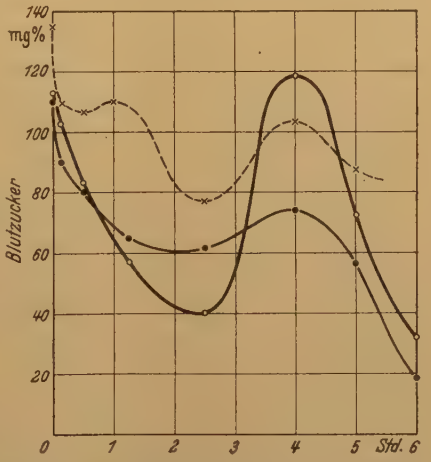


Abb. 6. Blutzuckerkurven nach Coffein (50 mg/kg) bei Ratten 6 Wochen nach der Nebennierenexstirpation. Hypertrophie der akzessorischen Nebennieren (marklos) autoptisch bestätigt.

angegeben haben: Adrenalin bewirkt einen raschen, kurzen und hohen Blutzuckeranstieg, während Cortin eine langsame, prolongierte und niedrigere Hyperglykämie verursacht. Sie vermuten, daß Adrenalin und Cortin den Zucker auf verschiedene Art mobilisieren.

Als letztes Glied in der Kette unserer Beweisführung haben wir 4 nebennierenlosen Ratten direkt nach der Operation eine Woche lang 2mal täglich je 0,5 cm³ eines Nebennierenrindenextraktes vom Rind injiziert, der uns in freundlicher Weise von Dr. Dwight J. Ingle in Michigan (USA.) zur Verfügung gestellt worden war, und in dem nach seiner Mitteilung 1 cm³ mindestens 0,2mg 17-Hydroxy-11-Dehydrocorticosteron entsprach. Von diesen 4 Tieren zeigten 3 einen primären Blutzuckerabfall wie die marklosen Ratten, und alle 4 den sekundären Blutzuckeranstieg nach Coffein (50 mg/kg) wie normale Tiere. Drei überlebten, und nur eine einzige starb 7 Stunden nach der Coffeininjektion (s. Abb. 7). Der Schutz, den der Nebennierenrindenextrakt nebennierenlosen Ratten gegen Coffein verleiht, wird damit unbestreitbar (vgl. Abb. 7 mit Abb. 4).

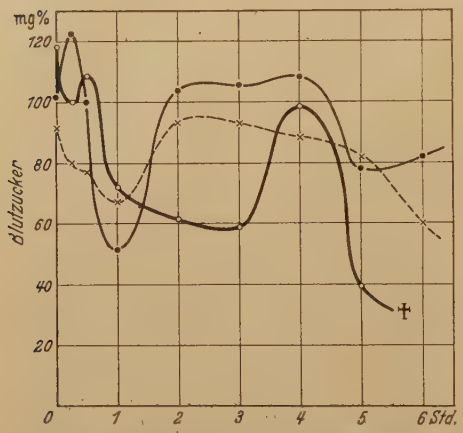


Abb. 7. Blutzuckerkurve nach Coffein (50 mg/kg) an nebennierenlosen Ratten eine Woche nach der Operation, nach täglicher Injektion eines Nebennierenrindenextraktes.

Normale Tiere, die die gleiche Dosis desselben Extraktes erhalten hatten, ließen mit einer Ausnahme ebenfalls den primären Blutzuckeranstieg nach Coffein vermissen, die zweite Hyperglykämie in der 4. Stunde war hingegen bei allen außergewöhnlich hoch (s. Abb. 8). Leerversuche an 10 normalen oder nebennierenlosen Ratten (Vorbehandlung mit dem Rinder-Nebennierenrindenextrakt während einer Woche, Aufnahme der Blutzuckerkurve direkt nach der letzten Injektion des Extraktes, ohne Coffein!), zeigten im allgemeinen eine leichte Tendenz zur Hyperglykämie, bei 3 Tieren trat aber in der 3., 4. oder 5. Stunde ein starker Blutzuckeranstieg auf, wie wenn vorher Coffein gegeben worden wäre. Wenn die Annahme richtig ist, daß Coffein das Rindenhormon frei macht, so ist es nicht erstaunlich, daß Injektionen von Coffein oder Cortin gleich wirken können.

Nishi sowie Trendelenburg und Fleischhauer waren überzeugt, daß die Nebennieren in das Geschehen eingeschaltet sind, das durch Coffein oder Diuretin ausgelöst wird. Sie konnten es aber bei dem

damaligen Stande der Forschung nicht genauer erklären. Es scheint uns wahrscheinlich, daß unsere Versuche mit Ratten ohne Nebennierenmark imstande sind, diese Lücke auszufüllen.

Weniger eindeutig waren die Resultate, die wir nach Splanchnicusdurchtrennung erhielten. Unter insgesamt 10 autoptisch kontrollierten Versuchen zeigte die Hälfte noch eine leichte primäre oder sekundäre Hyperglykämie. Sie ließen sich also durch doppelseitige Splanchnikotomie nicht vollständig unterdrücken. Immerhin waren beide Anstiege meist niedriger als bei normalen Tieren (s. Abb. 9). Das Intervall zwischen Operation und Experiment betrug stets 2 bis 4 Wochen.

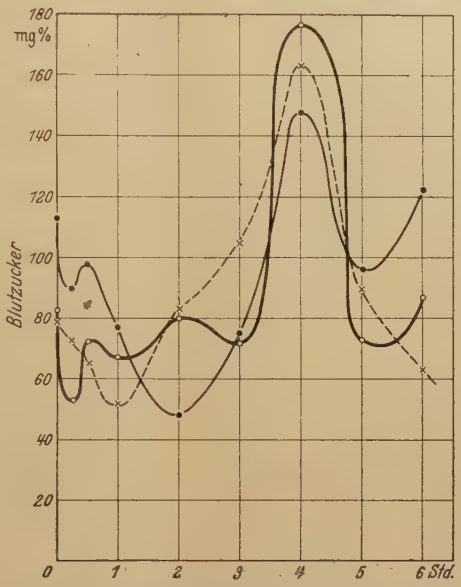


Abb. 8. Blutzuckerkurve nach Coffein bei normalen Ratten, Vorbehandlung der Tiere mit Nebennierenrindenextrakt während einer Woche.

Um eventuelle trophische Störungen als Ursache dieses Verhaltens auszuschließen, lähmten wir das sympathische System an anderen Ratten mit Dihydroergotamin, in der Dosis von 2mal 0,25 mg. Dieses wurde 10 Min. vor Beginn des Versuches, sowie nach $2^1/_2$ Stunden subkutan injiziert, um beide Phasen erfassen zu können. Kontrollversuche ergaben, daß Dihydroergotamin alleine den Nüchternblutzucker, über 6 Stunden verfolgt, bei 2 Ratten nur sehr wenig, bei 2 anderen aber stark senkte (von 114 mg-% auf 52 bzw. von 106 auf 12 mg-%). Die Adrenalinhyperglykämie vermag es vollständig zu unterdrücken (s. auch Rothlin). Auch hier zeigten die meisten Tiere noch einen leichten initialen

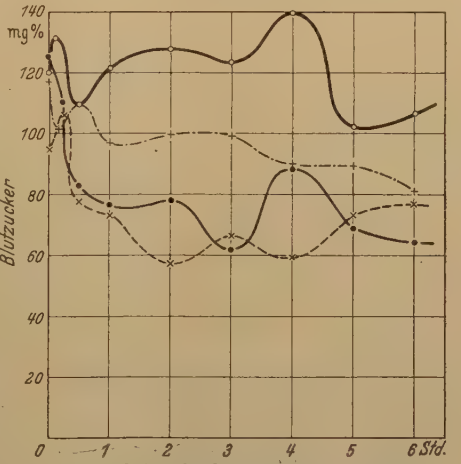


Abb. 9. Blutzuckerkurven nach Coffein an beiderseits splanchnikotomierten Ratten.

Blutzuckeranstieg oder eine deutliche sekundäre Hyperglykämie (s. Abb. 10).

Unsere Befunde erlauben es uns somit nicht, definitive Schlüsse über die Rolle des Zuckerzentrums bzw. der Nn. splanchnici unter Coffeineinwirkung zu ziehen. Vielleicht hat Jarisch recht, wenn er die Purine sowohl zentral als auch peripher angreifen läßt (s. o.).

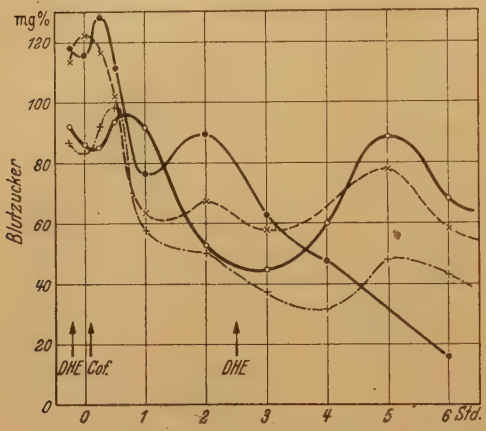


Abb. 10. Blutzuckerkurven nach Coffein an mit Dihydroergotamin behandelten Ratten.

Doppelseitige subdiaphragmatische Vagotomie ließ in allen 4 Fällen den 1. Blutzuckeranstieg ausfallen, der 2. war 3mal deutlich vorhanden (s. Abb. 11). Inwieweit hier sekundäre Veränderungen mitgespielt haben, ist schwer zu entscheiden. Die Tiere erkrankten alle an einer paralytischen Ösophagusdilatation, die Speisen blieben im Ösophagus stecken, die Ratten wurden apathisch, dyspnoisch und kachektisch. Ein Großteil der zum Versuch vorbereiteten Tiere starb an einem Lungenödem.

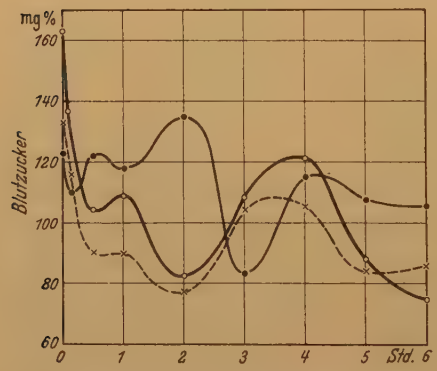


Abb. 11. Blutzuckerkurven nach Coffein an beiderseits vagotomierten Ratten.

Schon Jakoby erwähnt, daß eine reichliche Kohlenhydratmästung der Kaninchen mit Rüben die Conditio sine qua non sei für das Zustandekommen der Glykosurie. Ratten, welche wir anstatt der üblichen 15 Stunden 48 Stunden nüchtern gelassen hatten, zeigten aber keine Abweichung vom normalen Verhalten. Werden ihre Kohlehydratdepots aber aktiv entleert, so zeigen sie nicht nur keine Hyperglykämie, sondern sie sterben innerhalb der ersten 2—4 Stunden nach Coffein unter kontinuierlichem Blutzuckerabfall und hypoglykämischen Krämpfen. Die Blutzuckerkurve für tägliche Thyroxininjektionen (0,3 mg) während 3 Wochen verläuft gleich wie die für 3 Tage (s. Abb. 12, beachte die Ähnlichkeit mit Abb. 4), nur tritt der Tod schon 1—2 Stunden früher auf.

Thyreoidektomie läßt beide Blutzuckeranstiege etwas höher ausfallen als normal, verändert die Kurve qualitativ aber in keiner Weise.

Auch bei durch partielle Pankreatektomie (Entfernung von 95% des Pankreas) diabetisch gemachten Ratten lassen sich die beiden Phasen noch deutlich auseinanderhalten, nur bewegt sich die ganze Kurve auf einem höheren Niveau.

Hypophysektomierte Ratten starben unter starkem Abfall des Blutzuckers, wenn der Coffeinversuch am 4. Tag nach der Operation ausgeführt wurde. Die Kurve gleicht auffallend Abb. 4 oder 12. Wurde länger zugewartet (bis 1 Monat), so ergab sich kein einheitliches Bild. Die Tiere sind sehr labil, und der Blutzucker bewegt sich mit großen Ausschlägen sowohl nach oben als auch nach unten. Nebennierenextrakt ist auch hier imstande, den 2. Anstieg um ein Beträchtliches zu steigern und die Tiere am Leben zu erhalten. Injektion eines Extraktes von Kalbshypophyse während 7 Tagen beeinflußte das normale Bild mit den beiden Blutzuckergipfeln nicht. Der Hypophyse scheint somit im Coffeinversuch keine primäre Rolle zuzukommen.

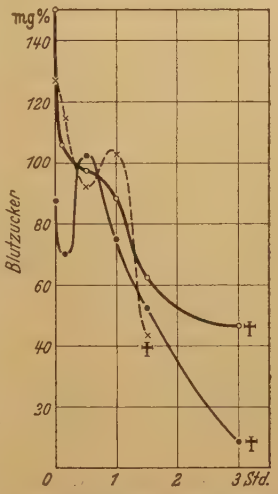


Abb. 12. Blutzuckerkurven nach Coffein an 3 Tage lang mit Thyroxin (je 0,3 mg) vorbehandelten Ratten.

Zusammenfassung.

An weißen Ratten wird die Hyperglykämie nach intravenöser Injektion von Coffein untersucht und festgestellt, daß sie zweiphasisch verläuft: ein erster Blutzuckergipfel tritt in der 1. Stunde, ein zweiter um die 4. Stunde herum auf. Der erste kommt nur zustande, wenn das Nebennierenmark erhalten ist. Er ist entweder emotionell, also unspezifisch, oder durch das Coffein spezifisch bedingt. Der zweite Gipfel ist an das Vorhandensein der Nebennierenrinde gebunden. Nebennierenlose Ratten sterben etwa 2 Stunden nach intravenöser Gabe von Coffein selbst in minimaler Dosierung unter kontinuierlichem Blutzuckerabfall. Nebennierenrindenextrakt schützt sie vor dem Tode und erzeugt wieder den zweiten Blutzuckergipfel wie bei normalen Tieren. Doppelseitige Splanchnicusdurchtrennung oder Lähmung des Sympathicus mit Dihydroergotamin kann die Höhe der beiden Blutzuckeranstiege in manchen Fällen vermindern, auf keinen Fall aber die Hyperglykämie regelmäßig unterdrücken. Der Reiz zur Leberzelle scheint somit nicht ausschließlich über den Splanchnicus zu verlaufen. Thyroxinmedikation (Ausschwemmung des Leberglykogens) wirkt wie

die Nebennierenexstirpation. Hypophyse und Pankreas sind an der Coffeinhyperglykämie nur indirekt beteiligt.

Literatur.

Bang, J.: Biochem. Z. **65**, 283 (1914). — Bardier, E., P. Duchain et A. Stillmunkes: C. r. Soc. Biol. **86**, 4 (1922). — Bock, J.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II/1, S. 590. Berlin: Springer 1920. — Boehm, R. u. F. A. Hoffmann: Arch. exper. Path. (D.) **8**, 271 (1878). — Cannon, W. B., A. T. Shohl and W. S. Wright: Amer. J. Physiol. **29**, 280 (1911/12). — Dwight, J. Ingle: Briefliche Mitteilung. — Jakoby, C.: Arch. exper. Path. (D.) **35**, 213 (1895). — Jarisch, A.: Pflügers Arch. **158**, 502 (1914). — Lascano-Gonzalez, J. M.: C. r. Soc. Biol. **116**, 451 (1934). — Miculicich, M.: Arch. exper. Path. (D.) **69**, 128 (1912). — Mikami, Shozo: Ref. Ber. Physiol. **57** (1926). — Nishi, M.: Arch. exper. Path. (D.) **61**, 401 (1909). — Pfeiffer, H.: Z. exper. Med. **10**, 1 (1920). — Pollak, L.: Arch. exper. Path. (D.) **61**, 376 (1909). — Richter, P. F.: Z. klin. Med. **35**, 463 (1898). — Rose, U.: Arch. exper. Path. (D.) **50**, 14 (1902). — Rothlin, E.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 1254. — Satake, Y.: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **17**, 333 (1931). — Sato, H. and T. Aomura: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **13**, 117 (1929). — Stenström, Th.: Biochem. Z. **49**, 225 (1913). — Trendelenburg, P. u. K. Fleischhauer: Z. exper. Med. **1**, 369 (1913). — Watanabe, M.: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **10**, 177 (1928). — Zwemer, R. L. and Ruth C. Sullivan: Endocrinology (Am.) **18**, 730 (1934).

Aus dem Pharmakologischen Institut der früheren Universität Breslau.

Kaffeewirkung bei sportlichen Übungen.

Von

Oskar Eichler,

Chirurgische Klinik Heidelberg unter Mitwirkung von Heinz-Wilko Klein und Heinz Stephan*.

(Eingegangen am 3. Juli 1948.)

Bei der Auffindung des Kaffees als Genußmittel wird wohl die günstige Wirkung auf die körperliche Leistungsfähigkeit eine ebenso große Bedeutung gehabt haben wie die erzeugte Euphorie. Daß eine spezielle Leistung verbessert werden kann, ist wiederholt nachgewiesen worden[1]. Um so erstaunlicher ist es, wenn es Herxheimer[2] nicht möglich war, eine Leistungsverbesserung bei sportlichen Übungen aufzufinden. Man könnte das vielleicht darauf zurückführen, daß er als Übung den 100 m Lauf wählte. Wenn man annimmt, daß erst das Moment der Ermüdung wirksam sein müßte, um eine Koffeinwirkung hervortreten zu lassen, daß also völlig ausgeruhte Organe optimal arbeiten, dann wird man das Resultat verstehen.

Jedoch erschien uns eine Nachprüfung seiner Befunde, sowohl mit größeren Mengen von Koffein als auch auf andere Übungen erweitert, wünschenswert.

Methodik.

Wir verabfolgten nicht das reine Koffein, sondern das gesamte Kaffeegetränk. Als Kontrolle diente uns dieselbe Lage — ein guter saurer Kostarika — jedoch war das Koffein bis auf den kleinen zulässigen Rest (bei uns 0,06%) entfernt worden. Die Versuchsperson wußte nicht und konnte es auch am Geschmack nicht entscheiden, ob sie ein koffeinhaltiges oder koffeinfreies Getränk zu sich nahm.

Bei der Wahl der Dosierung verfolgten wir mehrere Zwecke. Zunächst sollte die Menge Koffein groß genug sein, um nach den bisherigen Resultaten eine deutliche Wirkung erwarten zu lassen. In den Versuchen von Kraepelin und Hoch[3] am Ergographen fand sich der Beginn einer nachweisbaren Begünstigung von 0,1 g Koffein ab, mit derselben Menge gelang es Schirlitz[4] am Fahrradergographen eine Verbesserung der Ökonomie und Arbeitsleistung zu demonstrieren, während Herxheimer[2] mit 0,25 g Coff. natr. benz. = 0,125 g Koffeinbase

* Herr Dr. Klein und Dr. Stephan hätten das Anrecht, diese Arbeit voll verantwortlich mit zu publizieren. Das ist jedoch nach den Bestimmungen nicht möglich, da sie verschollen sind. Über einen Teil der Versuche wurde kurz durch H. W. Klein: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **190**, 204 (1938) in einem Vortrag berichtet.

[1] Übersicht siehe O. Eichler: Kaffee und Koffein. Berlin 1938, S. 41ff. — [2] Herxheimer, H.: Münch. med. Wschr. **1922**, 1339. — [3] Kraepelin u. Hoch: Kraepelins psychologische Arbeiten, Bd. 1, S. 378. 1896. — [4] Schirlitz, K.: Arb.physiol. **2**, 273 (1929).

bei seinen Sportversuchen jede Wirkung vermißte. Demgemäß wählten wir die doppelte Dosis, also 0,25 g Koffein.

Außerdem wollten wir mit dieser Dosierung auch prüfen, inwieweit sich unerwünschte Nebenwirkungen zeigten, sei es Schlaflosigkeit, Störungen von seiten des Kreislaufs oder sonst des Zentralnervensystems usw. Auch diese Absicht wies uns auf dieselbe Dosis, da sie schon oberhalb des im täglichen Haushalt Üblichen lag, aber noch innerhalb der z. B. während eines Aufenthaltes im Kaffeehaus oder bei einer Kaffeegesellschaft verzehrten Menge (Versuche 1937/38).

Unsere Versuchspersonen tranken dabei durchweg, wenn überhaupt, nur selten Kaffee. Wir mußten auch sicher sein, daß sie nicht gerade vorher schon Koffein zu sich genommen hatten, so daß zusammen mit unserer Dosis der Bereich der zu erwartenden Toxizität erreicht wurde. Das hätte unsere Anordnung gestört und wir legten auf die Befragung in dieser Richtung den größten Wert.

Um diese Menge im üblichen Kaffeegetränk unterzubringen, wäre eine große Flüssigkeitsmenge zu trinken gewesen. Das bedeutete aber eine extra Belastung des Magen-Darmkanals, vielleicht auch von Kreislauf und nicht zuletzt Niere. Um das zu vermeiden, mußte ein ganz hoch konzentriertes Getränk genommen werden, dessen Zubereitung besonderer Sorgfalt bedurfte, damit die Extraktion des Kaffeepulvers genügend exakt erfolgte, denn es war natürlich nicht möglich, jede Kaffeeprobe einzeln einer chemischen Analyse zu unterwerfen, die zudem zeitraubend ist.

25 g gemahlenen Kaffees wurden in einem Glas 5—8 Min. mit 200 cm^3 gerade siedenden Wassers auf dem Wasserbade extrahiert. Nach Filtration enthielten die 180—185 cm^3 Kaffeeaufguß 0,25 g Koffein. Gewiß war damit die Flüssigkeitsmenge auf einem niederen Niveau gehalten, aber dafür ein sehr bitteres Getränk gewonnen. Um den Geschmack abzustumpfen, wurden einige Kubikzentimter Kondensmilch und etwas Zucker zugefügt.

Mit der Höhe der Konzentration trat als neue Nebenwirkung eine Belästigung des Magens auf. Nach den Versuchen von BEHRENS und MALORNY[5] sind diese lokalen Wirkungen vor allem bei saurem Kaffee zu erwarten. Zur Zeit unserer Versuche (1937/38) waren diese Störungen nicht bekannt. Unsere Befunde am Menschen bestätigten also die am Hund gewonnenen von BEHRENS und MALORNY[5] noch nachträglich. Damit solche Effekte beim gesunden Menschen überhaupt hervorkommen, ist die Höhe der Konzentration (dazu vielleicht die Herkunft) des Kaffees notwendig. Beim Magenkranken bedingen sie einen wesentlichen Teil der schlechten Verträglichkeit des Kaffees gegenüber dem Tee (s. [1]) und sind auf die Röstprodukte zurückzuführen.

Noch einige Worte über den uns zur Verfügung stehenden Personenkreis. Alle waren in gutem Trainingszustand und zeigten ziemlich gleichmäßige Leistungen. Die meisten standen vor dem Erwerb des deutschen Sportabzeichens, insgesamt 174 verschiedene Personen, 46 Frauen, der Rest Männer und Jugendliche eines Sportlehrganges, der im Breslauer Stadion abgehalten wurde.

Die Übungen wurden zum kleinsten Teil als Einzelübungen ausgeführt, weit überwiegend aber in Form eines Dreikampfes in der Reihenfolge 100 m Lauf, Kugelstoßen und Weitsprung.

Die Prüfung in den beiden letzten Übungen erfolgte entsprechend den Bestimmungen des Deutschen Sportverbandes in 3maliger Wiederholung. Wir verwerteten dabei sowohl den Durchschnitt als auch die beste Leistung. Beim Kugelstoß, einer technischen Übung, war am leichtesten eine schlechtere Leistung zu erwarten, wenn Koffein überdosiert wurde, weil jede zentrale Erregung die Koordinationen besonders leicht stören konnte.

[5] BEHRENS, B. u. G. MALORNY: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **194**, 369 (1940).

Der Verlauf der Versuche.

Zuerst folgten wir dem Verfahren von HERXHEIMER. Versuchspersonen wurden einer Leistungsprobe unterworfen, nachdem sie vorher koffeinhaltigen (Kaffee C) oder koffeinfreien Kaffee (Kaffee O) stets in oben angegebener Form erhalten hatten. Am nächsten Tage erhielten sie die andere Kaffeeform und dann wiederholten sie ihre Übungen. Dieses Verfahren ergab keine verwertbaren Resultate und wir mußten hier HERXHEIMER bestätigen, der keine Wirkung sah, obwohl wir die doppelte Dosis anwandten. HERXHEIMER macht aber in seiner Arbeit besonders darauf aufmerksam, wie sehr die Leistung abhängig ist von Beschaffenheit des Platzes, vom Wetter, von Laune u. ä., d. h. von Ereignissen des Tages. Wir schlossen im Hinblick auf die Vielfalt der Varianten aus unseren Versuchen, daß trotz der großen Zahl von über 40 eingesetzten Versuchspersonen die Streuungen der Einzelleistungen so groß waren, daß ein einwandfreies Resultat gar nicht zu erwarten war, gerade auch nach den HERXHEIMERschen Bemerkungen.

Tabelle 1.

	Nach Kaffee C	Nach Kaffee O
Leistungsverbesserung . .	79,5%	25,0%
Leistungsgleichstand. . .	4,5%	2,8%
Leistungsverschlechterung	15,9%	72,2%

Deshalb wurde unser Verfahren entsprechend abgeändert und zwar entsprechend Beobachtungen von THOMSON und Mitarbeitern, sowie ZABLUDOWSKI (s. [1]). Wurde eine Übung innerhalb von 1—2 Stunden nach dem ersten Male wiederholt, dann waren die Resultate vorwiegend schlechter als vorher. Wenn also nach einem Getränk die Resultate sich besserten, vielleicht sogar auch nur gleich blieben, dann war das als ein günstiger Erfolg des dargereichten Getränkes zu buchen.

Also führte die Versuchsperson ihre Übungen bzw. den ganzen Zyklus des Dreikampfes aus, erhielt dann die Tasse Kaffee, wobei sie nicht wußte, welche Art ihr gegeben wurde, und wiederholte die Übungen in dem Zeitraum von $^1/_2$—2 Stunden nachher.

Wir geben die erhaltenen Resultate nicht nach dem Ausmaß der Verbesserung wieder, weil man solche Leistungsverbesserungen nicht gut nach Prozent messen kann. Man müßte dann als Ausgangspunkt den Abstand vom Weltrekord nehmen und feststellen, um wieviel sich die Person diesem zeitbedingten Ideal genähert hat. Wir begnügen uns mit der Angabe, ob eine Verbesserung, Verschlechterung oder ein Gleichbleiben resultierte.

Die Resultate beim *100-m-Lauf* gibt Tabelle 1 wieder. 44 Personen hatten Kaffee C, 36 Kaffee O erhalten.

Die ideale Versuchsanordnung wäre es gewesen, wenn man dieselbe Übung am nächsten Tage mit denselben Versuchspersonen aber mit gewechselten Kaffeearten vorgenommen hätte. Dieser 4fachen Beanspruchung unterzogen sich leider nur wenige. Jedoch ist uns außerdem bei weiteren 19 (männlichen) Versuchspersonen diese Versuchsanordnung möglich gewesen. Hierbei können sich nun folgende Kombinationen ergeben:

1. Mit Kaffee C eine bessere, mit Kaffee O eine schlechtere Leistung
2. „ „ „ „ „ „ „ „ „ gleiche „
3. „ „ „ „ „ „ „ „ „ bessere „
4. „ „ „ „ gleiche, „ „ „ „ schlechtere „
5. „ „ „ „ „ „ „ „ „ gleiche „
6. „ „ „ „ „ „ „ „ „ bessere „
7. „ „ „ „ schlechtere, „ „ „ „ schlechtere „
8. „ „ „ „ „ „ „ „ „ gleiche „
9. „ „ „ „ „ „ „ „ „ bessere „

Bei diesen Versuchen trat die Kombination 1. in 13 Fällen, 2. in 1 Fall, 3. in 3 Fällen, 4. in 1 Fall und 9. in 1 Fall auf.

Diese Resultate zeigen viel eindeutiger die unzweifelhafte Wirksamkeit des koffeinhaltigen Getränkes, denn nur einmal war die Leistung nach C schlechter geworden, ohne C aber in 14 Fällen.

Beim *Kugelstoßen* erhielten 36 Personen den koffeinhaltigen, 24 den koffeinfreien Kaffee. Die Resultate geben wir auf Tabelle 2 wieder.

Tabelle 2.

	Einzelleistung		Durchschnittsleistung	
	nach Kaffee C	nach Kaffee O	nach Kaffee C	nach Kaffee O
Leistungsverbesserung . .	66,7%	29,2%	72,2%	41,7%
Leistungsgleichstand. . . .	8,3%	—	—	4,2%
Leistungsverschlechterung	25,0%	70,8%	27,8%	54,2%

Die durchschnittliche Leistung wurde nach Kaffee O häufiger verbessert als die Einzelleistung. Aber gerade hier ist die Wirkung des Kaffees O sehr viel besser als bei allen anderen Übungen. Wir werden uns die Frage vorlegen, ob hier das warme Getränk vorteilhaft wirkt, da die Übungen meist im Herbst stattfanden.

Der *Weitsprung* wurde ausgeführt von 35 Personen mit Kaffee C und 24 mit Kaffee O. Die Resultate legen wir auf Tabelle 3 nieder.

Die Beurteilung dieser Resultate verlangt natürlich die Stellungnahme zu der Frage Ermüdung. Ist das Schlechterwerden der Übung bedingt durch Ermüdung? Man wird das Ermüdungsmoment auch sonst nicht ausschließen können, da die Prüfungen meistens am Nachmittag erfolgten. Daß die Personen dann nicht voll leistungsfähig auf

Tabelle 3.

	Einzelleistung		Durchschnittsleistung	
	nach Kaffee C	nach Kaffee O	nach Kaffee C	nach Kaffee O
Leistungsverbesserung . .	54,3%	4,2%	57,1%	16,7%
Leistungsgleichstand . .	2,9%	12,5%	—	—
Leistungsverschlechterung	42,8%	83,3%	42,9%	83,3%

den Platz kamen, ist verständlich. Aber die Resultate waren sogar eindeutiger bei den Versuchen, die am Vormittage gleich früh, also in voller Frische vorgenommen wurden. Wir erhielten mit Kaffee C folgende Resultate. Von 10 Versuchspersonen waren im 100-m-Lauf 8, beim Kugelstoßen 9, beim Weitsprung nur 6 besser als vor der Verabreichung des Getränkes.

Wir werden in jedem Fall bei unserer Art der Prüfung ein Element der Ermüdung annehmen. Jedoch wird die Ermüdung am Tage von Person zu Person sehr viel wechselnder sein als in den Morgenstunden, wo nur die Ermüdung durch die Leistung des Versuchs selbst eintritt. Vielleicht, daß damit die größere Gleichmäßigkeit der Befunde überhaupt seine Erklärung findet. In jedem Fall sind die Erfolge beim Weitsprung stets am schlechtesten. Das liegt wohl daran, daß diese Übung stets zuletzt erfolgte, wo also die Zufuhr des Kaffees schon meist rund 2 Stunden zurücklag, wo also mit einem Abklingen der die Muskelbewegungen begünstigenden Koffeinwirkung zu rechnen ist. Das kann man auch zum Teil bei den psychologischen Prüfungen wahrnehmen[1].

Eine Reihe von Experimenten wurde beim Hochsprung mit demselben Erfolg ausgeführt. Die Zahl der Resultate ist zu klein, um mehr als die Richtung ablesen zu können. Bei anderen Sportarten offenbarte sich nun in den wenigen orientierenden Versuchen die ganze Schwierigkeit einer einwandfreien Beweisführung. Beim Schwimmen ist der Wärmehaushalt sehr wichtig. Da kann das warme Getränk allein schon von Vorteil sein. Bei den Mittelstrecken, 400, 800 m ist die Technik des Laufes, sowie das Verhalten des Kreislaufs von ebensolcher Bedeutung wie die Muskelleistung usw. Es ist sehr schwer, daran heranzukommen. Daß aber koffeinhaltige Getränke bei Dauerübungen gerne genommen werden, davon konnten wir uns überzeugen, als bei der Deutschlandfahrt von den Radfahrern große Mengen Coca-Cola verbraucht wurden.

Bei den hier registrierten günstigen Wirkungen darf man nicht auf eine Erschöpfung sämtlicher Kraft„reserven“ schließen, sondern wesentlich ist dabei eine Verbesserung der Ökonomie beteiligt, die bei Ermüdung leidet (s. [4]). Zu einer Ausschöpfung ist die Dauer der

Wirkung zu gering, nicht solange wie bei Pervitin in den Versuchen von LEHMANN und Mitarbeitern[6].

Die subjektiven Symptome.

Uns bleibt jetzt noch, über das stets registrierte Befinden der Versuchspersonen nach dem Abschluß des Versuches zu berichten. Teilweise verabfolgten wir das Getränk auch an Versuchspersonen wiederholt, um die geklagten Beschwerden zu prüfen, stets ohne, daß die Versuchsperson wußte, welches Getränk gereicht worden war[7]. Aber nach der Übung konnten die meisten aus der Frische beurteilen, ob sie den koffeinhaltigen Kaffee erhalten hatten (Tabelle 4).

Vielfach kamen Sportler, wenn sie vor der Ablegung der Leistungsprüfung standen, mit der Bitte, ihnen den „richtigen" Kaffee zu geben, da die Leistungen tatsächlich teilweise beträchtlich verbessert waren.

Vor allem wurden aber alle nach unangenehmen Empfindungen gefragt, wie man sie nach der Höhe der Koffeindosierung durchaus erwarten kann. Das Resultat geben wir auf Tabelle 4 wieder.

Tabelle 4.

Kaffeesorte	Personenzahl	Zentrale Reizwirkung	Lokale Reizwirkung	Subjektiv belebende Wirkung	Wirkung am Herzen
O	75	5,3%	10,6%	4— 4,3%	0%
C	99	7,1%	8,1%	73—80 %	2%

Unter zentraler Reizwirkung verstanden wir Einschlafstörungen und sonstige Sensationen. Da auch der koffeinfreie Kaffee zu solchen Beschwerden führte, werden wir es auf eine reflektorische Wirkung von seiten des Magens zurückführen müssen, zumal die Beschwerden zusammen auftraten. Die Röstprodukte sind für diese Effekte verantwortlich zu machen, wie es am Magen des Hundes von BEHRENS und MALORNY dargelegt wurde. Daß aber eine solche Magenwirkung, die sich in geringer Übelkeit und Druck bis Schmerzen des Magens äußerte, auch zentrale reflektorische Wirkung haben kann (darunter auch 2mal Einschlafstörungen!), ist durch unsere Versuche erwiesen. Damit ist aber auch klar, daß von manchem Kranken, die eine geringere Reizwirkung auf den Magen besitzen, die Kaffeesorten, besonders aber auch Tee, besser vertragen werden, trotz gleichen Koffeingehaltes.

[6] LEHMANN, O., H. STRAUB u. A. SZAKALL: Arb.physiol. **10**, 680 (1939).

[7] Einer weiblichen Versuchsperson war vom Arzt wegen Palpitationen unter anderem der Genuß von Kaffee untersagt worden. Hier vertrug sie das starke Getränk ohne Beschwerden, wobei sie allerdings nicht wußte, daß sie Kaffee C erhalten hatte.

Die Wirkung am Herzen bestand weniger in Palpitationen als in einem Druckgefühl über der Brust.

Uns scheint es, als ob die zentralen Störungen, die dem Koffein ohne weiteres zugeschrieben werden müssen, dann eher vorkommen, wenn gleichzeitig viel Flüssigkeit getrunken wird. Daher wird dann der dicke türkische Kaffee soviel besser vertragen. Eine Adsorption an den fein gemahlenen Kaffeesatz kommt in unseren Versuchen nicht in Frage. Bei den Schlafstörungen spielt zum Teil die Diurese und der Druck auf die Blase eine Rolle.

Zusammenfassung.

Es werden Versuche mitgeteilt, mit koffeinfreiem und koffeinhaltigem Kaffee die sportliche Leistung beim 100-m-Lauf, Kugelstoßen und Weitsprung zu beeinflussen. Koffein in der Menge von 0,25 g hat eine unzweifelhaft günstige Wirkung, aber nach 2 Stunden beginnt sie abzuklingen. Nach der Anlage der Versuche spielt das Element der Ermüdung eine Rolle.

Von Nebenwirkungen ist vor allem auf die Reizung der Magenwände bei konzentriertem Getränk hinzuweisen. Von daher können auch zentrale Wirkungen reflektorisch ausgehen. Sonstige übliche Nebenwirkungen kamen bei dieser Dosierung nur in einem geringen Prozentsatz vor.

Aus der I. Chirurgischen Universitätsklinik Wien
(Vorstand: Prof. Dr. L. Schönbauer).

Tierexperimentelle Untersuchungen über die Resorption und die Ausscheidung einiger Sulfonamide nach intraperitonealer Applikation.

Von

Dr. C. L. Paul Trüb.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. April 1948.)

Die Sicherheit des Wirkungseintrittes der Sulfonamidtherapie (Sulfonamid(e) abgekürzt: SA) steht nach Domagk in Abhängigkeit von einer Höhe der Konzentration der SA im Blut und im Gewebe, die geeignet ist, die Bakterien zu schädigen, und von der Anwesenheit von Leukozyten und Histiozyten, die die geschädigten Bakterien phagozytieren und verdauen können. Die therapeutische Wirkungsbreite der SA wird aber auch beeinflußt von der Schnelligkeit, der Stärke und der Dauer der Zugänglichkeit der SA zum Krankheitsherd; die lokale Anwendungsweise wird wegen der höheren Konzentration am Ort der Infektion eine größere Wirkung entfalten können als bei parenteraler oder oraler Darreichung (Domagk).

Nach Einführung einer örtlichen SA-Anwendung bei den verschiedenartigen chirurgischen Infektionen im Jahre 1935 durch F. Bosse und seine Mitarbeiter (G. Bosse und K. H. Jaeger) wurde von diesen auch bereits im Jahre 1936 bei abgegrenzter Peritonitis nach Appendizitis und Salpingitis purulenta perforata eine lokale Anwendung von Prontosil S forte erfolgreich versucht.

Im Gegensatz zu dem bisher nur beschränkten Umfang einer peroralen oder parenteralen Darreichung der SA zur Behandlung der lokalen oder diffusen Peritonitis, über deren Erfolg Veröffentlichungen von Ladd Botsford und Curnen, Stewart und Bates, Newell, Ravdin, Rhoads und Lockwood, Lockwood und Ravdin vorliegen, hat die lokale Verwendung der verschiedenen SA zur Peritonitistherapie in Form einer intraperitonealen Applikation (abgekürzt: i.p. A.) seit 1940 eine breite Entwicklung genommen, über deren Ergebnisse auf Grund von klinischen Beobachtungen und auch von tierexperimentellen Untersuchungen neben anderen Autoren vor allem Sterling, Mueller, Thompson, Brabson und Walter, Jackson, Baumgartner, Harild, Mueller und Thompson, Dees, Lockwood und Rhoads, Gardinier, Bloch, Sturm, Jackson und Coller, Jentzer und Calame berichtet haben.

Schürch hat zu den Ergebnissen der bisherigen klinischen Untersuchungen und experimentellen Arbeiten kritisch Stellung genommen und dargelegt, daß die Arbeiten über die i.p. A. von SA — vornehmlich die im anglo-amerikanischen Schrifttum — keinen klaren Einblick geben, ob die SA bei i.p. A. eine größere Wirksamkeit entfalten als bei parenteraler Anwendung, ob ein lokal-intraperitonealer antibakterieller Effekt erzielt wird, ob sie i.p. eine erhöhte und schnell

einsetzende toxische Wirkung bedingen, ob eine lokale Schädigung der Serosa mit ihren Folgen in Form von Verklebungen oder Verwachsungen stattfindet, und schließlich, ob und wie die in ihrer chemischen Konstitution sich unterschiedlich verhaltenden SA-Präparate hinsichtlich der allgemeinen und lokalen Wirkung und Nebenwirkung ein verschiedenartiges Verhalten aufweisen.

Die Resorption aus dem Bauchfell.

Nach der von Mond und Cunningham auf Grund der bisherigen chirurgischen Erfahrungen und tierexperimentellen Erkenntnisse gegebenen zusammenfassenden Darstellung über die Resorption aus dem Bauchfell werden wäßrige, kristalloide Lösungen (isotonische Salzlösungen sowie wäßrige, nicht eiweißhaltige Lösungen) durch die physikalischen Kräfte der Osmose und der Diffusion sowie durch die hydrostatischen Druckänderungen schnell resorbiert. Die Moleküle einer Lösung passieren zunächst die Endotheldecke und gelangen in ein von Lymphräumen und Kapillaren durchsetztes Gewebe. Alle nicht körpereigenen kristalloiden Substanzen, die die Blutkapillaren gut permeieren, gelangen bei schneller Blutströmung infolge eines steilen Diffusionsgefälles zwischen Lymph- und Blutkapillaren ausschließlich auf dem Blutweg in den Körper, während alle übrigen Stoffe, insbesondere die kolloidalen, infolge Zurückhaltung von den Kapillarwänden auf dem Lymphwege resorbiert werden. Die Geschwindigkeit der Resorption wird nach Mond durch die Änderung des hydrostatischen Druckes, unter dem die zu resorbierenden Lösungen stehen, durch die Größe der resorbierenden Oberfläche, vor allem der Blutkapillaren, und schließlich auch durch eine mechanische Rührung der Flüssigkeit (z. B. erhöhte Darmperistaltik) beeinflußt. Die große Flächenausdehnung der Peritonealhöhle, auf die zuerst G. Wegener bereits 1876 hinwies, bewirkt, daß die beträchtliche Resorptionsfähigkeit und Resorptionskraft des Bauchfellraumes schlagartig in seiner Ganzheit in Tätigkeit tritt, wenn auch nach den von L. Schönbauer im physiologischen Versuch am Hund getroffenen Feststellungen mindestens eine Gleichwertigkeit der Resorptionsfähigkeit und der Resorptionskraft von Unterhautzellgewebe und Bauchfell besteht.

Da die Resorption aus dem Bauchfell auf dem Blutwege die weit überwiegende Bedeutung hat, so „ist der Pfortaderkreislauf — nach Orator — als Schlüsselpunkt der Resorption im oberen Bauchraum anzusehen".

Bisherige tierexperimentelle Untersuchungsergebnisse über die Resorption von SA aus dem Bauchfell.

Nach dem von Jackson und Coller, Jentzer und Calame, Draper und Kauer auf Grund tierexperimenteller Untersuchungen gewonnenen Ergebnis über die Resorption von SA aus dem Bauchfell erfolgt diese im Einklang mit den angeführten patho-physiologischen Erfahrungstatsachen über die Peritonealresorption zeitlich schnell und mengenmäßig hoch nach den ermittelten Blutkonzentrationswerten, vor allem auch im Blut der V. portae (Jackson und Coller), jedoch in Abhängigkeit von der jeweiligen SA-Löslichkeit.

Nach den Blutspiegelbefunden von Jackson und Coller wurde bei Verwendung einer Dosis von 0,5 g SA/kg Körpergewicht im Tierversuch (Hund) der Höchstgipfel des Blutspiegels innerhalb von 4 Stunden (40 mg-%) erreicht. Es erfolgt dann innerhalb von 24 Stunden ein Abfall auf niedrige Blutspiegelwerte (10—20 mg-%) und nach 48 Stunden waren die i.p. applizierten SA aus dem Blut eliminiert. Jentzer und Calame fanden im Kaninchenversuch bei Verwendung einer 1 g Cibazol (Sulfanilamidothiazol bzw. dessen Natriumsalz) enthaltenden

Lösung (5,5 cm³) einen Höchstgipfel des Blutspiegels von 9,67 mg-% nach 2 Stunden, nach 5 Stunden einen schnellen Abfall, nach 18 Stunden einen Blutspiegel von 3,8 mg-%, nach 24 Stunden eine fortschreitend stärker werdende Senkung des Blutspiegels, der nach 48 Stunden 0,96 mg-% betrug, eine völlige Ausscheidung des Cibazol bis zum 4. Tag. Bei i.p. A. von 1 g leicht löslichem Irgamid-Na-Pulver wurde nach 18 Stunden ein Blutspiegel von 3,85 mg-%, nach 48 Stunden ein solcher von 1,92 mg-% erreicht, während nach i.p.A. von 1 g des von den SA am schwersten löslichen Prontosil rubrum nach 48 Stunden ein Blutspiegelwert von 2,9 mg-% und nach 48 Stunden ein solcher von 1,9 mg-% feststellbar war. Die Versuche von Jentzer und Calame zeigen, daß die SA in Lösung und die leicht löslichen SA-Pulver schneller und ausgiebiger resorbiert werden, daß aber ein schwer lösliches SA bei noch relativ guter Resorption eine größere und anhaltendere Depotwirkung entfaltet.

Draper und Kauer ermittelten im Tierversuch den Höchstgipfel der Blutkonzentration nach 6 Stunden und ein Absinken des Blutspiegels auf den Nullstand nach 65—78 Stunden.

Die von Jackson und Coller gemachte Beobachtung über das Auftreten von Hepatitis bei 9 Kranken mit Erhöhung des Bilirubinspiegels 24 Stunden bis 7 Tage nach i.p. A. von 5 g SA wurde mit der sehr schnell erreichten, sehr hohen Konzentration des SA im Blut der Pfortader, die eine stärkere Belastung der Leber zu bedingen geeignet war, in Zusammenhang gebracht. Sie veranlaßte die Autoren einmal Bestimmungen der SA-Blutspiegelwerte in der V. portae durchzuführen und weiterhin die Resorption der SA durch Mischung mit einer Traganthlösung zu verzögern.

Da die Angiostomie der V. portae mittels Kanüle im Hundeversuch den Autoren nicht gelang, wurde in einer Reihe von Einzelversuchen nach i.p. A. von SA beim Hund die V. portae in verschiedenen Zeitabständen freigelegt. Es wurden aus ihr Blutproben gleichzeitig mit solchen aus der V. jugularis zur Bestimmung der SA-Konzentration entnommen. Es fand sich während der Resorptionsphase eine beträchtliche höhere Konzentration des SA im Pfortaderblut als im peripheren Blut. 30 Min. nach der i.p. A. des SA betrug der SA-Blutspiegel in der V. portae noch 40% des Spiegelwertes im peripheren Blut. Nach 4 Stunden waren jedoch die Blutspiegelwerte gleich. Die Versuche, durch Verwendung von Traganthlösung als Trägersubstanz der SA die Resorptionsgeschwindigkeit zu mindern und die überaus hohe Konzentration im Portavenenblut im Beginn der Resorptionsphase zu senken, um toxische Nebenwirkungen auf die Leber zu verhüten, waren aber ohne Erfolg. Nach den im Tierexperiment (Hund) erstellten vergleichenden Resorptionskurven war keine merkliche („appreciable") Verlangsamung der Resorption der in Traganthlösung suspendierten SA nachweisbar.

Versuche am Hund über die Resorption und Ausscheidung von SA nach i.p. A.

Über die Ausscheidungsverhältnisse der i.p. angewendeten SA im Harn, die einen Einblick in die Resorptions- und Ausscheidungsgeschwindigkeit vermitteln können, liegen — soweit dies aus dem deutschen und dem zugänglichen ausländischen Schrifttum ersichtlich ist — noch keine systematischen tierexperimentellen Untersuchungen vor. Ebensowenig ist eine in bestimmten Zeitabständen fortlaufend durchgeführte Bestimmung des SA-Blutspiegels im Portavenenblut, aus dessen Höhe ein Rückschluß auf das mengenmäßige Angebot der

SA an die Leber zu gewinnen ist, und im peripheren Blut bisher tierexperimentell erfolgt.

In einer Reihe von Tierversuchen am Hund wurde die Resorption und die Ausscheidung von vier in die Bauchhöhle eingebrachten SA verschiedenartiger Löslichkeit und chemischer Konstitution geprüft.

Von den auf Grund der bisher vorliegenden tierexperimentellen und klinischen Versuchsergebnissen für die i.p. A. geeigneten SA wurden für die Hundeversuche M.P.-Puder 2209 (75% Prontalbin, 10% Marfanil hydr., 15% Naphthalin-1,5-disulfosaures Salz des Marfanil), Eleudron (p-Aminobenzolsulfonamidothiazol), Debenal (2-p-Aminobenzolsulfonamidopyrimidin) und außerdem das flüssige SA-Präparat Tibatin in 40%iger Lösung (Galaktosid des 4,4'-Diaminodiphenylsulfon) verwendet. Als Trägersubstanz dieser vier SA wurde physiologische Kochsalzlösung benutzt.

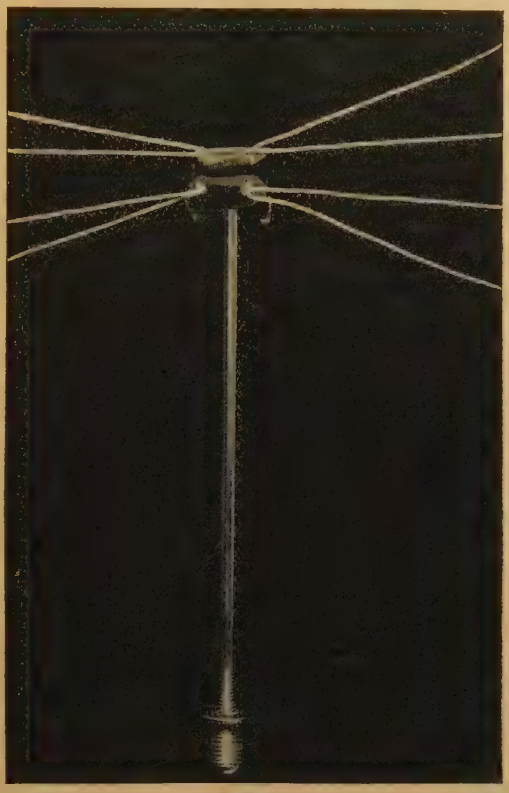


Abb. 1. Modifizierte Pfortaderkanüle $^1/_2$ der natürlichen Größe. (Aus Mitt. des Grenzgebietes der Med. u. Chir. 47, 296, FISCHER-Jena).

I. Allgemeine Versuchsanordnung.

1. Das Verfahren zur Ausführung von Blutentnahme aus der Pfortader.

Zur Ausführung der Bestimmungen der SA-Konzentration im Pfortaderblut nach i.p. A. der SA in einer Suspension in physiologischer NaCl-Lösung wurde zwecks Ermöglichung von Portavenenpunktionen nach dem von E. S. LONDON 1923 angegebenen Verfahren um die operativ freigelegte Pfortader eine Kanüle gelegt und diese in der von HABERLAND vorgeschlagenen Art durch Seidenfäden fixiert. Um eine Lockerung oder ein Verrutschen der Kanüle und ein Verschieben der Portavene — Vorkommnisse, die nach HABERLAND eine auf $1^1/_2$—2 Monate beschränkte Versuchsdauer bedingen — zu vermeiden, wurde der um die Pfortader gelegte Fixationshalbring, dessen zentrale runde Öffnung in die auf den

Halbring aufmontierte Kanüle einmündet, im Bereich seines dem Pfortadergefäß anliegenden inneren Wandteil mit einem entsprechend dimensionierten und an dem offenen Halbringteil aufgeschnittenen Gummirohr versehen, das mittels der Seidenfäden an dem offenen Halbring fixiert war. Durch diese in Abb. 1 zur Darstellung gebrachte *Modifikation* des Aufbaues und der Form der Pfortaderkanüle konnte die Versuchszeit infolge des Festhaltens und des unveränderlichen Sitzes der Kanüle bis zu 4 Monaten verlängert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Modifikation der Kanülenform ist die Möglichkeit des Empfindens eines deutlichen Widerstandes bei der Punktion der Portavene mittels Rekordspritzenhohlnadel beim Eindringen der Hohlnadel durch die Pfortaderkanüle gegen das in den Fixationshalbring gelegte Gummirohr, nach dessen Überwindung die Hohlnadel mit ziemlicher Sicherheit im Blutgefäß sich befindet, so daß ein Ansaugen von Pfortaderblut leicht möglich ist. Bei einem weiteren Vordringen stößt die Hohlnadel dann erneut gegen den der Kanüle gegenüberliegenden Gummirohrteil und zeigt damit die Lage der Hohlnadelspritze außerhalb der Pfortaderwand an. Durch die elastische Fixation des Fixationsringes mittels des an der Innenwand umlegten Gummirohres wird auch eine Schädigung der Venenwand und die Begünstigung des Eintrittes einer Pfortaderthrombose vermieden.

2. Menge der für die i.p. A. verwendeten SA-Präparate, Form der Applikation, Zeitintervalle für die Bestimmung der SA-Konzentration im Blut und Harn.

Im Hundeversuch wurden von Key und Frankel Sulfanilamid, Sulfapyridin oder Sulfathiazol in Pulverform, von Jackson und Coller Prontalbin in Pulverform angewendet. Englische Experimentatoren benutzten für die i.p. A. 0,8%ige Sulfanilamidlösungen, 1%-ige Natrium-sulfapyridinlösungen, 1%ige Sulfathiazollösungen oder Suspensionen und 1%ige Sulfabenamidlösungen. Von diesen SA-Präparaten war nach Throck und Morton nur Sulfapyridin infolge Reizwirkung auf das Bauchfell schlecht verträglich.

Jackson und Coller benutzten die Dosierung von 0,5 g Prontalbin auf 1 kg Körpergewicht. Die englischen Autoren gaben täglich i.p. Mengen von 0,07 g Sulfanilamid und Sulfapyridin in Lösung sowie 0,14 g Sulfathiazol in Suspension und 0,14 g Sulfabenamid in Lösung auf 1 kg Körpergewicht der Versuchshunde. Bei Anwendung dieses Dosierungsschemas wurden nach Angabe der genannten Autoren toxische Erscheinungen nicht festgestellt.

Die Löslichkeitsdaten für Prontalbin, Marfanil hydr., Eleudron und Debena sind:

	in Wasser bei	
	20° C	37° C
Prontalbin	0,7%	1,2%
Marfanil	39,0%	49,0%
Eleudron	0,06%	0,09%
Debenal	0,015%	0,03%

Bei der Dosierung des Tibatin in 40%iger Lösung wurde die von A. Barke gemachte Beobachtung über die ungestörte Verträglichkeit einer täglichen i.v. Injektion von 5—10 cm³ einer 20%igen Tibatinlösung zugrundegelegt und demnach als Einzelversuchsdosis 5 cm³ einer 40%igen Tibatinlösung, entsprechend 2,0 g Tibatin gewählt.

Die Versuchsdosis für die anderen zu vergleichenden SA-Präparate wurde einheitlich auf 1,0 g für das 10—15 kg schwere Versuchstier bemessen. Dem vor Beginn und während der Versuche nüchtern gehaltenen Hunde wurde die SA-

Trägerstoffmischung mittels einer Injektionsspritze von 50 bzw. 100 cm³ Fassungsvermögen nach Erwärmung im Wasserbad auf 37° C i.p. injiziert.

Nach der i.p. A. der SA in physiologischer NaCl-Lösung wurden Entnahmen von Blutproben aus der Pfortader durch die Pfortaderkanüle und aus einer Ohrvene ausgeführt, und zwar nach Ablauf von 15 Min., 30 Min., 1 Stunde, 2, 4, 6, 8, 24, 48 und 72 Stunden.

Zur Harnentnahme wurde ein Dauerkatheter benutzt; nach dessen Einführung wurde der Harn aus der Harnblase durch Ansaugen mittels Rekordspritze völlig entleert, alsdann die i.p. Injektion der SA-Präparate im Bereich des linken Mesogastrium vollzogen. Die Harnentnahme aus dem zwischen den Entnahmezeitpunkten verschlossen gehaltenen Dauerkatheter erfolgte im Verlauf von 8 Stunden zu den gleichen Zeitpunkten wie die Blutentnahme. In den folgenden 3 Tagen wurde erneut mittels Katheter nach 24, 48 und 72 Stunden Harn bis zur vollkommenen Blasenentleerung durch Ansaugen entnommen.

3. Für den chemischen Nachweis der SA im Pfortaderblut, im peripheren Blut und im Harn wurde die von Oesterheld *und* Druey *angegebene und von* Hein-Sekula *modifizierte Methode verwendet.*

Die Methodik ist folgende: Das zu untersuchende Blut bzw. der Harn wurden nach entsprechender Verdünnung mit Trichloressigsäure enteiweißt, das Filtrat mit Natriumnitrit diazotiert und nach Entfernung des überschüssigen Nitrits mit Sulfaminsäure mittels 1-sulfomethylaminonaphthalin-8-sulfosäure (Dinatriumsalz) gekuppelt. Die entstandene Farbverbindung wurde am fotoelektrischen Kolorimeter von Langer kolorimetriert.

Eine Bestimmung der azetylierten SA erübrigte sich bei dem völligen Fehlen des Azetylierungsvermögens beim Hund.

II. Versuchsbeschreibung und Versuchsergebnisse.

Versuch I.

Resorption und Ausscheidung von 5 cm³ 40%iger Tibatinlösung (2,0 g) gemischt mit 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung.

Versuchstag 8. 3. 44. Zwei Jahre alter männlicher Rattlerbastard (I), 11 kg Gewicht, Pfortaderkanülenträger, erhielt 8.45 Uhr mittels Injektion i.p. 5 cm³ einer 40%igen Tibatinlösung entsprechend 2 g Tibatin gemischt mit 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung nach Erwärmung auf 37° C im Wasserbad und nach 5 Min. langem Rühren der Mischung.

Tabelle 1 zeigt: 1. Die Ergebnisse der in den gewählten Zeitabständen ausgeführten Bestimmungen der Blutspiegelwerte im Pfortaderblut sowie im peripheren Blut. 2. Die Menge des ausgeschiedenen Tibatin in den einzelnen Harnmengen. 3. Die aus Harnmenge und Zeitmaß errechnete Tibatingesamtmenge in den einzelnen Harnportionen und das je Minute ausgeschiedene Tibatin.

Die kurvenmäßige Darstellung (Abb. 2) der Tibatinkonzentration zeigt einen jähen, steilen Anstieg im Portavenenblut mit dem Maximum nach 35 Min. und einen ebenso jähen, steilen Abfall auf den nach 15 Min. ermittelten Erstwert nach Ablauf 1 Stunde, an den sich alsdann eine gleichmäßig abfallende Kurve der Tibatinkonzentration anschließt. Im Gegensatz zu dieser erheblichen Tibatinkonzentration mit ihrem jähen Anstieg und Abfall im Portablut steht die wesentlich niedrigere Tibatinspiegelkurve im peripheren Blut, die in ziemlich gleichmäßigem Anstieg den Höchstwert nach 2 Stunden erreicht, um in den folgenden

Tabelle 1.

Zeit		Peripher mg-%	Porta mg-%	Zeit		Peripher mg-%	Porta mg-%
8. 3.	9^{00}	5,9	27,4	9. 3.	8^{30}	1,3	2,0
	9^{20}	11,4	+35,6	10. 3.	10^{00}	1,0	1,6
	9^{45}	14,2	28,8	11. 3.	10^{00}	0,4	1,0
	10^{45}	+18,5	24,6				
	12^{45}	9,2	15,4				
	14^{45}	4,7	9,4				
	16^{45}	2,6	3,0				

Zeit		Harnmenge cm³	mg-%	mg in der Gesamtmenge des Harns	mg Tibatin ausgeschieden je Minute
8. 3.	9^{00}	7,5	190	14,25	0,95
	9^{20}	2,0	2550	51,0	2,55
	9^{46}	2,0	4410	88,2	3,4
	10^{50}	5,0	+4800	240,0	3,75
	12^{47}	14,0	3380	473,2	+4,04
	14^{46}	8,0	1765	141,2	1,18
	16^{45}	14,0	1835	256,9	2,16
9. 3.	8^{30}		504,2		
10. 3.	10^{00}		320,4		
11. 3.	10^{00}		48,3		

+ bedeutet ermittelter Höchstwert.

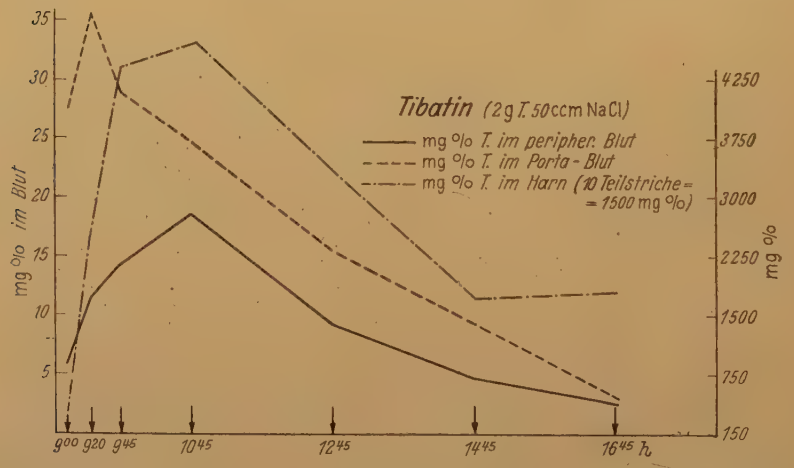


Abb. 2.

6 Stunden einen ebenfalls gleichmäßigen Abfall aufzuweisen. Nach Ablauf von 8 Stunden haben sich die Blutkonzentrationskurven bis auf 0,4 mg-% Abstand genähert. Auch in den folgenden Tagen übersteigt die Tibatinkonzentration im Pfortader- diejenige im peripheren Blut noch um etwa 0,6 mg-%.

Bereits auf Grund dieses ersten Versuchsergebnisses konnte die von Jackson und Coller in ihren Hundeversuchen getroffene Feststellung, daß die SA-Blutspiegelwerte im Blut der V. portae und im peripheren Blut nach 4 Stunden die gleichen sind, nicht bestätigt gefunden werden. Aber auch nach einem Zeitintervall von 35 Min. nach der i.p.A. von Tibatin war der Portablutwert noch um 24,2 mg-%, also um 210% höher als im peripheren Blut, bei Jackson und Coller nur um 40%. Es sei die Feststellung vorweggenommen, daß bei allen weiteren Versuchsen diese Beobachtung immer wieder gewonnen werden konnte. In Übereinstimmung mit Jentzer und Calame (Kaninchenversuche) wurde bei der i.p. Darreichung eines SA-Präparates in Lösung der höchste Wert im peripheren Blut nach 2 Stunden ermittelt.

Die mengenmäßige Zufuhr des i.p. eingebrachten Tibatin zur Leber ist bereits zu Beginn der Resorptionsphase (15—35 Min.) eine außerordentlich hohe und fällt erst von diesem Zeitpunkt an langsam und ständig ab.

Der größte je Minute errechnete Wert der im Harn ausgeschiedenen Tibatinmenge lag 4 Stunden nach der i.p. Tibatinverabfolgung. Am Ende des 1., 2. und 3. Versuchstages wird die Menge des mit dem Harn eliminierten Tibatin zunehmend geringer; am Ende des 4. Tages war die Ausscheidung beendet.

Der Wendepunkt von Resorption und Ausscheidung, erkenntlich am Höchstgipfel des Tibatinblut- und Harnwertes, liegt in der zweiten Stunde nach der i.p. A. des Tibatin.

Versuch II.

Resorption und Ausscheidung von 1,0 g M.P.-Puder 2209 suspendiert in 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung; Löslichkeit des Prontalbin im M.P.-Puder: bei 37° = 1,2%.

Versuchstag 10. 5. 44. Zwei Jahre alter männlicher Rattler (I), 15 kg Gewicht, Pfortaderkanülenträger, erhielt um 9 Uhr i.p. eine Injektion von 1,0 g M.P.-Puder 2209 suspendiert in 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung (2%ige Suspension) nach Erwärmen auf 37° C im Wasserbad und nach kräftigem Schütteln dieser 2%igen M.P.-Pudersuspension vor Einfüllung in die Injektionsspritze sowie auch innerhalb der Injektionsspritze unmittelbar vor der Injektion.

Die ermittelten Blutspiegelwerte des Prontalbin im Portavenenblut und im peripheren Blut sowie die Ausscheidungswerte im Harn zeigt Tabelle 2.

Die in Tabelle 2 angegebenen Werte beziehen sich nur auf das im Ausmaß von 75% im M.P.-Puder 2209 enthaltenen Prontalbin (p-Aminophenylsulfonamid), das mittels der Diazotierungsmethode bestimmt wurde. Eine Nachweismethode für das Marfanil hydr. und das Marfanil B ist noch nicht bekannt.

Nach dem Kurvenbild (Abb. 3) war der Maximalblutspiegelwert im Portavenenblut und gleichzeitig auch im peripheren Blut 30 Min. nach der i.p. A. erreicht, jedoch lag der Portablutspiegelwert des Prontalbin um 2 mg-% höher als im peripheren Blut. Nach steilem Abfall der beiden Blutkurven 1 Stunde nach der Injektion kam es im Verlauf von 7 Stunden zu einem fast parallelen, langsam

Tabelle 2.

Zeit		Peripher mg-%	Porta mg-%	Zeit		Peripher mg-%	Porta mg-%
10. 5. 44.	9^{00}	6,9	8,2	11. 5.	8^{30}	1,9	2,0
	9^{15}	+8,5	+10,8	12. 5.	8^{40}	0,7	0,75
	9^{45}	6,0	6,6	13. 5.	8^{30}	0	0
	10^{45}	5,2	6,1				
	12^{45}	4,8	5,5				
	14^{45}	3,5	4,3				
	16^{45}	2,8	3,1				

Zeit		Harnmenge cm³	mg-%	mg in der Gesamtmenge des Harns	mg M.P. ausgeschieden je Minute
10. 5.	9^{00}	9,5	695	65,0	4,3
	9^{15}	10,0	+1910	191,0	+12,7
	9^{45}	10,0	280	28,0	0,93
	10^{45}	6,5	570	37,05	0,51
	12^{45}	10,0	670	67,0	0,55
	14^{45}	10,0	620	62,0	0,51
	16^{45}	10,0	670	67,0	0,55
11. 5.	8^{30}		140		
12. 5.	8^{40}		35		
13. 5.	8^{30}		0		

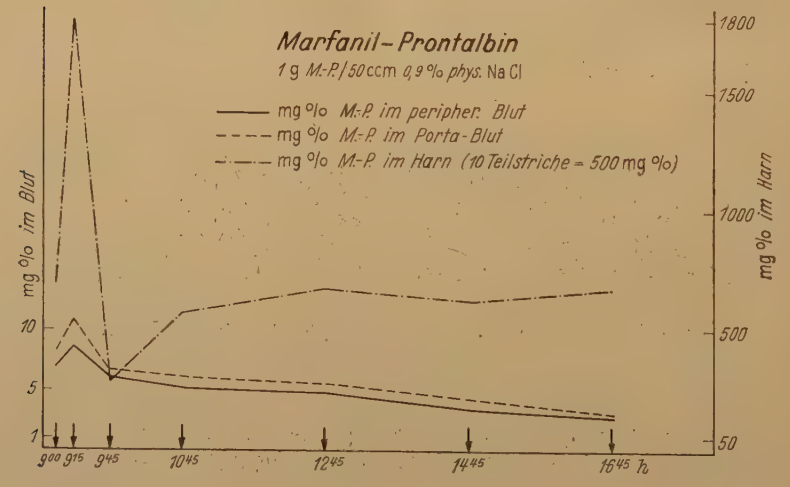


Abb. 3.

neigend sich hinziehenden Abfall der Blutspiegelkurven. Am Ende der 8. Stunde variierten die Blutwerte nur noch um 0,3 mg-% mit geringer Erhöhung des Konzentrationswertes im Portablut.

Auch nach 24 und 48 Stunden war nur eine unwesentliche Blutspiegelerhöhung im Portablut um 0,1 mg-% bzw. um 0,05 mg-% festzustellen.

Die mengenmäßig stärkste Ausscheidung des Prontalbin im Harn erfolgte in jähem steilen Anstieg bereits 30 Min. nach der i.p. A. Sie hatte je Minute den Höchstwert von 12,7 mg Prontalbin, alsdann trat ein ebenso steiler Tiefstand der Prontalbinharnausscheidung, und zwar auf den niedrigsten Wert von 0,51 mg Prontalbin ein. Bis zur 2. Stunde stellte sich ein erneuter Kurvenanstieg ein, der dann mit kleinen Schwankungen bis zur 8. Stunde anhielt. Am Ende des 3. Versuchstages war die Prontalbinausscheidung im Harn nicht mehr nachweisbar.

Der Wendepunkt in der Resorption und der Ausscheidung des bei 37° C etwa 1,2% löslichen Prontalbin lag bereits $^1/_2$ Stunde nach der i.p. Injektion des M.P.-Puders 2209 suspendiert in physiologischer NaCl-Lösung.

Versuch III.

Resorption und Ausscheidung von 1,0 g Eleudron suspendiert in 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung, Löslichkeit des Eleudron bei 37° C = 0,09%.

Versuchstag 17. 5. 44. Zwei Jahre alter männlicher Rattler (II), Gewicht 15 kg, Pfortaderkanülenträger, erhielt um 8.45 Min. eine i.p. Injektion von 1,0 g Eleudron suspendiert in 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung (2%ige Suspension) nach Erwärmen auf 37° C im Wasserbad und nach kräftigem Schütteln dieser 2%igen Eleudronsuspension vor Einfüllen in die Injektionsspritze sowie innerhalb der Injektionsspritze unmittelbar vor der Injektion.

Tabelle 3 bringt die bei Ermittlung der Eleudronblutspiegelwerte und Eleudronharnausscheidungswerte erzielten Ergebnisse.

Tabelle 3.

Zeit		Peripher mg-%	Porta mg-%	Zeit		Peripher mg-%	Porta mg-%
17. 5.	9^{00}	0,9	2,3	18. 5.	8^{30}	3,2	3,5
	9^{15}	1,9	3,4	19. 5.	8^{45}	1,4	1,5
	9^{45}	+ 17,3	+ 20,6	29. 5.	8^{05}	0	0
	10^{45}	12,2	15,5				
	12^{45}	11,4	14,1				
	14^{45}	9,6	11,2				
	16^{45}	6,8	7,5				

Zeit		Harnmenge cm³	mg- %	mg in der Gesamtmenge des Harns	mg Eleudron ausgeschieden je Minute
17. 5.	9^{00}	1,0	270	2,7	0,18
	9^{15}	1,0	970	9,7	0,6
	9^{45}	8,5	+ 2310	196,35	+ 6,54
	10^{45}	10,5	1870	196,35	3,27
	12^{45}	21,5	1040	223,6	1,9
	16^{45}	21,0	680	142,8	1,2
	14^{45}	30,5	450	137,75	1,15
18. 5.	8^{30}		120		
19. 5.	8^{45}		65		
20. 5.	8^{05}		0		

Die Maximalblutspiegelwerte des Eleudron liegen — wie aus der Kurve Abb. 4 ersichtlich ist — in der 1. Stunde nach der i.p. Injektion. Die Portablutkonzentration übersteigt die periphere Blutkonzentration um 3,3 mg-%. Die Maximalhöhe wird in steilem Anstieg nach Ablauf $^1/_2$ Stunde nach der Injektion erreicht. Nach Verlauf von 2 Stunden ist es bereits wieder zur Kurvensenkung gekommen, die dann gleichmäßig mit sanfter Abwärtsneigung bis zur 8. Stunde anhielt. Der Unterschied zwischen Portablutwert und peripherem Blutwert betrug nach 8 Stunden 0,7 mg-%. Der erhöhte Wert betraf wiederum das Portablut. Nach 24 und 48 Stunden war die Eleudronkonzentration im Portablut noch geringfügig um 0,3 mg-% bzw. um 0,1 mg-% höher.

Das Maximum der Eleudronausscheidung im Harn 1 Stunde nach der i.p. Injektion fällt mit dem Höchstgipfel des Eleudronblutwertes im Portablut und im

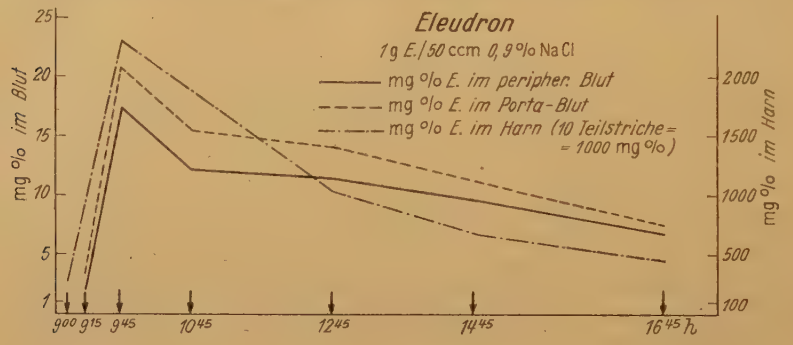


Abb. 4.

peripheren Blut zusammen. Es folgt ein mäßig steiler Abfall der Harnausscheidungskurve bis zur 4. Stunde und eine ziemlich gleichmäßige Senkung bis zum Ablauf der 8. Stunde der Versuchszeit. Nach 72 Stunden war das Eleudron mit dem Harn restlos ausgeschieden.

Der Wendepunkt in der Resorption und der Ausscheidung des bei 37° C etwa 0,09%ig löslichen Eleudron lag 1 Stunde nach der i.p. Injektion der eleudron-physiologischen NaCl-Lösungssuspension.

Versuch IV.

Resorption und Ausscheidung von 1,0 g Debenal suspendiert in 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung; Löslichkeit des Debenal bei 37° C: 0,03%.

Versuchstag 3. 5. 44. Zwei Jahre alter männlicher Rattler (II), 15 kg Gewicht, Pfortaderkanülenträger, erhielt um 9 Uhr eine i.p. Injektion von 1,0 g Debenal suspendiert in 50 cm³ physiologischer NaCl-Lösung (2%ige Suspension) nach Erwärmen auf 37° C im Wasserbad und nach kräftigem Schütteln dieser 2%igen Debenalsuspension vor Einfüllen in die Injektionsspritze sowie innerhalb der Injektionsspritze unmittelbar vor der Injektion.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Ermittlung der Blutspiegelwerte im Portablut und im peripheren Blut sowie die Werte der Ausscheidung des Debenal im Harn.

Das Blutkurvenbild (Abb. 5) zeigt, daß nach der i.p. Injektion des von den im Hundeversuch benutzten SA-Präparaten am schwersten löslichen Debenal

Tabelle 4.

Zeit	Peripher mg-%	Porta mg-%	Zeit	Peripher mg-%	Porta mg-%
3. 5. 9^{15}	3,5	4,0	4. 5. 8^{40}	4,0	4,5
9^{30}	4,2	4,7	5. 5. 10^{10}	2,2	2,5
10^{00}	4,5	5,0	6. 5. 11^{00}	0,8	1,1
11^{00}	4,9	5,6			
13^{00}	6,6	+ 10,8			
15^{00}	+ 7,1	8,5			
17^{00}	6,5	6,8			

Zeit	Harnmenge cm³	mg-%	mg in der Gesamtmenge des Harns	mg Debenal ausgeschieden je Minute
3. 5. 9^{15}	2,0	105	2,1	0,14
9^{35}	2,5	320	8,05	0,4
10^{10}	8,0	+ 453	36,24	+ 1,04
11^{00}	10,0	140	14,0	0,25
13^{00}	7,0	186	13,02	0,11
15^{05}	10,0	124	12,04	0,1
17^{00}	10,0	78	7,8	0,06
4. 5. 8^{40}		36		
5. 5. 10^{10}		19		
6. 5. 11^{00}		5		

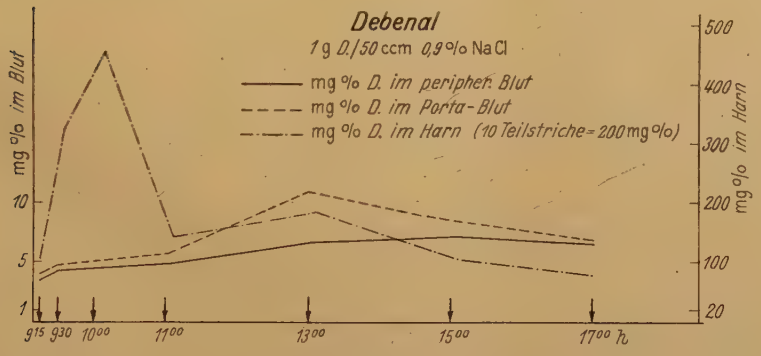


Abb. 5.

erst nach 4 Stunden im Portablut, und erst nach 6 Stunden im peripheren Blut die Maximalkonzentration erreicht worden war. Im Portablut setzte erst nach Ablauf von 2 Stunden eine Kurvensteigung als Ausdruck einer vermehrten Resorption ein. Nach Erreichen des Kurvengipfels nach 4 Stunden erfolgte eine flache Absenkung der Portablutkurve. Die periphere Blutkurve weist einen flach verlaufenden Anstieg auf, der bis Ende der 8. Versuchsstunde anhielt. Eine scharf ausgeprägte Gipfelbildung ist während der 8stündigen Versuchsperiode nicht vorhanden, ein Kurvenverlauf, der auf ein Fehlen der bei den anderen Versuchen ermittelten Resorptionsschwankungen hinzuweisen scheint. Am Ende des 1. Versuchszeitraumes haben sich die beiden Blutkurven weitgehend genähert. Es besteht noch eine Blutspiegeldifferenz von 0,3 mg-%; diese Konzentrationserhöhung liegt auch wieder im Portablut. Nach 24 Stunden

war der Portablutspiegel noch um 0,5 mg-%, nach 48 Stunden noch um 0,3 mg-% und nach 72 Stunden noch um 0,3 mg-% höher.

Bereits 1 Stunde nach der i.p. Injektion der debenal-physiologischen NaCl-Lösungssuspension ist der Höchstgipfel der Debenalausscheidung im Harn unter steilem Kurvenanstieg erreicht, auf den ein ebenso steiler Kurvenabfall nach Ablauf einer Zeitperiode von 2 Stunden folgt. Im Verlauf der weiteren 6stündigen Versuchsperiode tritt nach 4 Stunden eine mit dem Höchstgipfel der Portablutkurve zusammenfallende erneute Erhöhung der Kurve des Debenalausscheidungswertes im Harn ein, an die sich ein flacher Abfall bis zur 8. Stunde anschließt.

Ein durch steile Gipfelbildung charakterisierter Wendepunkt in der Resorption und Ausscheidung ist bei dem Versuch mit in physiologischer NaCl-Lösung suspendiertem Debenal nicht erkennbar. Die Andeutung eines solchen findet sich 4 Stunden nach der i.p. Injektion des Debenal.

Vergleichende Betrachtung der ermittelten Versuchsergebnisse mit den im Schrifttum bekanntgegebenen.

Setzt man die Ergebnisse der Bestimmungen der Blutwerte im peripheren Blut, die nach i.p. A. der 4 SA-Präparate in physiologischer NaCl-Lösungsmischung, bzw. -suspension im Hundeversuch innerhalb der festgesetzten Zeitintervalle ermittelt werden konnten, in Vergleich zu den Ergebnissen der Tierversuche anderer Autoren, so ergibt sich nur eine relative Vergleichsmöglichkeit mit den von Jentzer und Calame im Kaninchenversuch ermittelten Blutwerten.

Nach i.p. Verabfolgung von 1,0 g des Natriumsalzes des Cibazol (Sulfonilamidothiazol) in Lösung (5,5 cm^3) wurde nach 2 Stunden ein Blutspiegel von 9,64 mg-%, nach 48 Stunden ein solcher von 0,95 mg-% ermittelt. In den durchgeführten Hundeversuchen nach i.p. A. von 2,0 g Tibatin in 40%iger Lösung (5 cm^3) in der beschriebenen Versuchsanordnung war der Blutwert nach 2 Stunden 18,5 mg-%, entsprechend der doppelt so hoch gewählten Anwendungsdosis auch fast doppelt so hoch (um 0,78 mg-% geringer wie im Cibazolversuch beim Kaninchen.) Bei dem im Kaninchenversuch i.p. angewendeten schwer löslichen Prontosil rubrum betrug der periphere Blutwert nach 48 Stunden 1,9 mg-%; das zu 0,03% bei 37° C lösliche Debenal bedingte bei i.p. A. in NaCl-Lösungssuspension im gleichen Zeitabstand einen Blutspiegel von 2,2 mg-%, ein Wert, der sich dem des Prontosil rubrum bis auf 0,3 mg-% nähert.

Vergleichende Bewertungen der im Tierversuch im peripheren Blut ermittelten Blutspiegelhöhen z. B. mit den von Jackson und Coller uud anderen Autoren ermittelten SA-Blutkonzentrationen scheitern, weil teils weit höhere Dosen — oft mehrmals täglich — verabreicht oder SA-Verbindungen mit verschiedenen Löslichkeitsdaten benutzt wurden, oder aber weil keine eindeutigen Angaben über die Entnahmezeiten der Blutproben nach der i.p. A. der SA-Präparate vorliegen.

Zusammenfassung.

Es werden Ergebnisse von Untersuchungen über Resorption und Ausscheidung der Sulfonamide Tibatin (40%ige Lösung), M.P.-Puder 2209, Eleudron und Debenal nach intraperitonealer Applikation, suspendiert in physiologischer NaCl-Lösung, im Hundeversuch mitgeteilt:

1. Die Resorption der Sulfonamide aus dem Bauchfell erfolgte — entsprechend der großen Resorptionsfähigkeit und Resorptionskraft des Bauchfellraumes — sehr schnell und sehr ausgiebig. Die Maximalkonzentration der Sulfonamide im Pfortaderblut war bei flüssigen und leichter löslichen Sulfonamiden nach der intraperitonealen Applikation bereits nach $^1/_2$ Stunde, bei schwerer löslichen Sulfonamiden nach 1 Stunde und bei schwerst löslichen Sulfonamiden nach 4 Stunden erreicht.

2. Der Sulfonamidblutwert im Pfortaderblut wurde während einer Versuchsperiode von 8 Stunden und im Verlauf von 3 Versuchstagen fortdauernd höher befunden als im peripheren Blut. Die Blutspiegel im Pfortaderblut waren gegenüber denen im peripheren Blut periodenweise um mehr als 200% erhöht.

3. Im peripheren Blut war der Höchstblutwert frühestens nach $^1/_2$ Stunde, spätestens — je nach Löslichkeit der Sulfonamide — nach 6 Stunden erreicht.

4. Die Prüfung der Ausscheidung der intraperitoneal applizierten Sulfonamide im Harn — errechnet aus der je Minute ausgeschiedenen Sulfonamidmenge — ergab eine Maximalausscheidung der leichter löslichen Sulfonamide nach $^1/_2$ Stunde, der schwerer löslichen Sulfonamide nach 1 Stunde. Bei intraperitonealer Applikation von 2,0 g einer 40%igen Tibatinlösung erfolgte die Höchstmengenausscheidung im Harn nach 4 Stunden.

5. Es wird eine für eine mehrmonatige Blutentnahme aus der Pfortader der Versuchshunde geeignete Modifikation der Pfortaderkanüle beschrieben.

Die Tierversuche wurden im Jahre 1944 ausgeführt, ihre Ergebnisse konnten aus zeitbedingten Umständen nicht früher bekanntgegeben werden.

Literatur.

Barke, A.: Dtsch. tierärztl. Wschr. **1942**, 245. — Baumgartner: Schweiz. med. Wschr. **1942**, 1277. — Bloch, H. R.: Zbl. Chir. **70**, 1617 (1943). — Bosse, P.: Med. Welt **1911 I**, 791. — Dtsch. dent. Wschr. **1938**, 116. — Bosse, P. u. G.: Fschr. Ther. **1939**, 202. — Bosse und Jaeger: Dtsch. med. Wschr. **1936**, 1831. — Cunningham: Physiol. Rev. (Am.) **6**, 242 (1926). — Dess: Mississipi Doctor **18**, 215 (1940). Domagk, G.: Chemotherapie bakterieller Infektionen, a. a. O., S. 93. — Domagk, Gerhard: Medizin und Chemie, Bd. 4. — Med. Welt **1942 I**, 247. — Zbl. Bakter. usw. Orig. I **144**, 206 (1939). — In Domagk u. C. Hegler: Chemotherapie bakterieller Infektionen, 2. Aufl. Leipzig 1942. — Dtsch. med. Wschr. **1943 I**, 379. Draper u. Kauer: Zit. nach Müller u. Thompson, a. a. O. — Druey, J. u. Oesterheld: Helvet. chim. Acta **25**, 753 (1942). — Gardinier: Lancet **1942**, 195. — Haberland, H. F. O.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. V, Teil 3 C, S. 181—189. 1934. — Harild, Sv.: Zbl. Chir. **69**, 581 (1942). — Jackson, H. C.: Ann. Surg. **113**, 1069 (1941). — Jackson, H. C. u. Coller: J. amer. med. Assoc. **118**, 194 (1942). — Jentzer, A. u. A. Calame: Schweiz. med. Wschr. **1943**, 601. — Key and Frankel: Ann. Surg. **113**, 284 (1941). — Ladd,

W. S., Th. W. Botsford and E. C. Curnen: J. amer. med. Assoc. **113**, 1455 (1939). — Lockwood, J. S. and J. E. Rhoads: S. Clin. North Amer. **19**, 1547 (1939). — Lockwood, J. S. and J. S. Ravdin: Surgery etc. **8**, 43 (1940). — London, E. S.: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 4, 2. Hälfte Lieferg 127. 1927. — Mond: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. IV, S. 152—156. Berlin 1929. — Mueller and Thompson: J. amer. med. Assoc. **189**, 118 (1942). — Newel, N. T. jr: Surgery etc. **68**, 760 (1939). — Oesterheld, G.: Schweiz. med. Wschr. **1940**, 459. — Orator, V.: Darm und Bauchfell. In Pathologisch-physiologische Grundlagen der Chirurgie, Bd. III, S. 74. Leipzig 1939. — Ravdin, Rhoads and Lockwood: Surgery etc. **111**, 53 (1940). — Schön, L. u. Bauer: Arch. klin. Chir. **130**, 427 (1923). — Wien. klin. Wschr. **1923**, 21. — Schürch: Schweiz. med. Wschr. **1943**, 262. — Sterling Mueller, R.: J. amer. med. Assoc. **116**, 329 (1941). — Stewart u. Bates: Zit. nach Domagk u. Hegler, a. a. O. S. 186. — Sturm: Zbl. ges. inn. Med. **34**, 1219 (1943). — Thompson, J. E., J. A. Brabson and J. M. Walter: Surgery etc. **72**, 722 (1941). — Throck and Morton: Proc. Mayor Clin. **16**, 423 (1941). — Wegener, G.: Arch. klin. Chir. **20**, 151 (1876).

Aus der I. Chirurgischen Universitätsklinik in Wien
(Vorstand: Prof. Dr. L. Schönbauer).

Glomerulusfiltration und Rückresorption verschiedener Sulfonamide nach intraperitonealer Applikation im Tierversuch.

Von

Dr. C. L. Paul Trüb.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 22. Juni 1948.)

In zahlreichen, unter vielfach gestalteten und verschiedenartig geänderten Versuchsbedingungen durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen, die von den klassischen Forschungsergebnissen von C. Wegener über Flächenausdehnung und Resorptionsfähigkeit des Bauchfells ihren Ausgang nahmen, fand sich *eine* der von G. Wegener gefundenen 4 Grundeigenschaften des Bauchfells (Flächenausdehnung, Resorptions- und Transsudationsfähigkeit, Plastizität), die der Fähigkeit zur außerordentlich schnellen und gewaltigen Resorption immer wieder bestätigt.

Die toxische oder sonstige Wirkung von Arzneistoffen im Organismus erfolgte vom Peritoneum aus fast eben so schnell, wie bei der unmittelbaren Einbringung in die Blutbahn. Die vom Bauchfell in der Stunde aufgesaugten Mengen flüssiger bzw. gelöster Substanzen sind sehr hoch, es können zwischen 3% und 8% (etwa $^1/_{20}$) des Körpergewichtes der Versuchstiere resorbiert werden.

Im Einklang mit diesen pathophysiologischen Erkenntnissen über die Schnelligkeit und das Ausmaß der Peritonealresorption konnte durch Versuche am Hund auch eine zeitlich schnelle und mengenmäßig hohe Resorption der Sulfonamide aus dem Bauchfell festgestellt werden, die zu hohen Werten der Konzentration der Sulfonamide im Pfortaderblut führte (C. L. P. Trüb, vorangehende Arbeit).

Die Maximalkonzentration der Sulfonamide im Pfortaderblut nach intraperitonealer Applikation wurde bei flüssigen und leicht löslichen Sulfonamiden bereits nach einer $^1/_2$ Stunde, bei schwerer löslichen Sulfonamiden nach 1 Stunde und bei schwerst löslichen Sulfonamiden nach 4 Stunden erreicht. Der Sulfonamidblutspiegel im Pfortablut war gegenüber dem Blutspiegel im peripheren Blut zeitweise um mehr als 200% erhöht und wurde während einer Versuchszeitspanne von 8 Stunden und im Verlauf von 3 Versuchstagen fortdauernd höher befunden, als im peripheren Blut.

Im peripheren Blut wurde der Bluthöchstwert frühestens nach einer $^1/_2$ Stunde, spätestens, je nach Löslichkeit der Sulfonamide, nach 6 Stunden erreicht. Die Höchstmengenausscheidung der leicht löslichen Sulfonamide im Harn fand sich nach einer $^1/_2$ Stunde, die der schwer löslichen Sulfonamide nach 1 Stunde.

Die bisher im Tierversuch am Hund erzielten Ergebnisse über die peritoneale Sulfonamid-Resorption- und Ausscheidung waren Anlaß, in weiteren Tierversuchen die Ausscheidung von Sulfonamiden aus dem Bauchfell mit einer Nierenfunktionsprüfung zu vergleichen.

Der im Tierexperiment vollzogene Vergleich der Sulfonamidausscheidung aus dem Bauchfell mit einer Nierenfunktionsprüfung sollte die Frage beantworten, ob nach intraperitonealer Applikation der Sulfonamide die genaueren Ausscheidungsverhältnisse wie Glomerulusfiltration und Rückresorption der Sulfonamide sich ähnlich verhalten den Feststellungsergebnissen in früheren gleichgerichteten Versuchen beim Menschen nach intravenöser Sulfonamidapplikation (M. Sekula), oder ob und inwiefern sich Abweichungen nachweisen ließen. Es sollte ermittelt werden, ob das „*Entharnungsvermögen*" der Nieren im Sinne von H. Rein — die „*Clearance*" von van Slyke — für die intraperitoneal applizierten Sulfonamide sich gleich oder ähnlich verhält, wie nach intravenöser Injektion von Sulfonamiden.

I. Allgemeine Versuchsanordnung.

Für die am Hund durchgeführten Versuche wurden folgende Sulfonamidpräparate verschiedener Löslichkeit verwendet:

1. Prontalbin (p-aminobenzolsulfonamid); Sulfanilamid,
2. Eleudron (p-aminobenzolsulfonamidothiazol); Sulfathiazol,
3. Sulfapyridin (α-p-aminobenzolsulfonamidopyridin),
4. Debenal (2 p-aminobenzolsulfonamidopyrimidin); Sulfapyrimidin.

Als *Nierenfunktionsprüfungsmethode* diente die bereits in den Versuchen beim Menschen von M. Sekula benützte Kreatininprobe von Brandt-Rehberg in der Modifikation von Popper-Mandel, die die Erfassung der geringen Mengen des Kreatinins im Blut mit genügender Genauigkeit ermöglicht.

Das Prinzip dieser Nierenfunktionsprüfung mittels der Kreatininmethode ist folgendes:

Die Kreatininkonzentration im Blut ist die gleiche wie die Kreatininkonzentration im Ultrafiltrat der Glomeruluskapillaren und die während einer bestimmten Zeitdauer im Harn ausgeschiedene Kreatininmenge ist — da das Kreatinin nach Passage des Ultrafilter der Glomeruluskapillare auch quantitativ im Endharn ausgeschieden wird —, die gleiche, die durch das Ultrafilter der Glomerulusmembran die Niere passiert. Von dem mitfiltrierten Wasser verfallen etwa 99% der Rückresorption durch Tubuli und Sammelröhrchen: die Urharnmenge entspricht dem im Harn ausgeschiedenen Kreatinin. Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$\frac{\text{Harnkonzentration}}{\text{Blutkonzentration}} \times \frac{\text{Harnmenge}}{\text{Minuten}}$$

Zieht man von diesem Glomerulusfiltrat die Harnmenge ab, die in der Minute ausgeschieden wird, so gewinnt man die Menge des auf dem Wege durch die Niere rückresorbierten Urharnwassers, das in Prozent des Glomerulusfiltrates ausgedrückt wird.

Die Rückresorption der Sulfonamide nach intraperitonealer Applikation wurde nach folgender Methode berechnet.

Das Rückresorbat *(RR_s)* einer Substanz *(S)* läßt sich in der Weise ermitteln, daß das mit Hilfe der Kreatininmethode ermittelte Glomerulusfiltrat *(GF_k)* mit dem Prozentgehalt der Substanz im Plasma *(P_s)* multipliziert und von diesem Wert, der die absolute in der Zeiteinheit filtrierte Substanzmenge darstellt, die in der gleichen Zeit im Harn ausgeschiedene Substanzmenge subtrahiert wird, das ist Harnkonzentration *(H)* × Harnmenge *(HM)* in der Zeiteinheit *(T)*. Die gefundene Zahl gibt die absolute in der Zeiteinheit rückresorbierte Substanzmenge an.

$$RR_s = GF_k \cdot P_s - \frac{H_s \cdot HM}{T}.$$

Das Rückresorbat wird in Milligramm und Prozent der filtrierten Substanzmenge angegeben.

Im Versuch wurden die 2jährigen männlichen Hunde vom Vorabend des Versuchstages an nüchtern gehalten, um eine Beeinflussung der Glomerulusfiltration und Rückresorption im Sinne der Steigerung oder Hemmung zu vermeiden.

Vor der intraperitonealen Applikation der Sulfonamide wurde die Harnblase der Versuchshunde mittels des eingeführten Dauerkatheters völlig entleert, die Entnahme noch vorhandener Restharnmengen erfolgte durch Ansaugen mit einer Rekordspritze. Alsdann erfolgte die Blutentnahme aus einer inzidierten Ohrvene. Im entnommenen Harn und Blut wurde Kreatinin als Vorwert bestimmt. Nun schloß sich die intraperitoneale Injektion eines der angegebenen Sulfonamide, die als Pulver in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert waren, mittels einer Injektionsspritze von 50—100 cm³ Fassungsvermögen nach Erwärmung im Wasserbad auf 37° C und nach kräftigem Schütteln an.

$^1/_2$ und 1 Stunde, $1^1/_2$ Stunden, 2, $2^1/_2$ und $3^1/_2$ Stunden nach der intraperitonealen Applikation der Sulfonamide wurden zuerst Harn durch Ansaugen mittels Rekordspritze bis zur völligen Entleerung der Harnblase entnommen, die Dauer der Entnahme zeitlich festgelegt und die gewonnene Harnmenge genau gemessen. Ebenso wurden nach erfolgter Harnabnahme der Zeitpunkt und die zeitliche Dauer der Blutabnahme genau festgelegt.

Im Harn und Blut wurden dann die Kreatininmenge und die Menge des ausgeschiedenen Sulfonamids bestimmt und Glomerulusfiltrat und Rückresorbat für Kreatinin und Sulfonamide errechnet. Für diese Berechnung wurde der Mittelwert der Anfangs- und Endkonzentration im Blut gewählt, weil im Gegensatz zum fast gleich hoch bleibenden Kreatininblutspiegel der Sulfonamidblutspiegel fortlaufenden Schwankungen mit An- oder Abstieg der Konzentration unterliegt. Im Hinblick auf die bei früheren Versuchen an Menschen und Tier festgestellten Schwankungen des Blutspiegels wurden die einzelnen Zeitabstände für die Ausscheidungs- und Rückresorptionsprüfung *kurz* bemessen und auch die Entleerung der Harnblase so ausgiebig wie nur möglich durch Ansaugen vorgenommen.

Die Blutkreatininwerte lagen bei den 4 Versuchshunden zwischen 0,98 mg-% und 1,78 mg-%, also höher als beim Menschen, jedoch in tierphysiologischer Breite. Die Werte der Glomerulusfiltration waren bei den Versuchstieren im Vergleich zum Menschen wesentlich niedriger und zeigten einen Niedrigstwert von 9,75 cm³ und einen Höchstwert von 52,7 cm³, wenn man von dem hohen Wert von 378,72 cm³ bei einer Harnmenge von 118 cm³ absieht.

In den früheren Versuchen am Menschen (M. Sekula) konnte in Bestätigung der Untersuchungen von Popper ermittelt werden, daß die schwankende Größe des Glomerulusfiltrates in Abhängigkeit von der Körpergröße und dem Körpergewicht steht und bei Frauen geringer als bei Männern ist. Derartige durch Körpergewicht und Körpergröße bedingte Unterschiede in der Glomerulusfiltration ließen sich bei den 4 Versuchstieren verschiedener Größe nicht eindeutig nachweisen. Im Einklang mit den Befunden beim Menschen (M. Sekula und

früher Popper) betrug das Rückresorbat zwischen 98,4%—99,8% des Glomerulusfiltrates, Werte, die der Norm entsprechen.

Als Methodik für den chemischen Nachweis der Sulfonamide im Blut und Harn wurde die in Versuchen beim Menschen (M. Sekula) verwendete Methode von Oesterheld und Druey unter Benutzung einer von M. Sekula ausgearbeiteten Modifikation benutzt.

Nach Enteiweißung des entsprechend verdünnten Blutes oder Harnes mit Trichloressigsäure wird das Filtrat mit Natriumnitrit diazotiert und nach Entfernung des überschüssigen Nitrits durch Aminosulfosäure mit 1-Sulfomethylaminonaphthalin-8-sulfosäure (Dinatriumsalz) gekoppelt. Die entstandene Farbverbindung wurde im photoelektrischen Kolorimeter von Langer kolorimetriert. Es konnte im Blut und Harn nur freies Sulfonamid, jedoch kein Azetylierungsprodukt der Sulfonamide bestimmt werden, da der Hund im Unterschied zum Menschen kein Azetylierungsvermögen für diese Verbindungen besitzt.

II. Versuchsbeschreibung und Versuchsergebnisse.

1. Versuch. Versuchstag 9. 8. 44; Glomerulusfiltration und Rückresorption von 1,0 g *Sulfanilamid*, das in 50 cm³ physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und nach Erwärmung im Wasserbad auf 37° C intraperitoneal einem langhaarigen Spitzbastard Nr. I injiziert wurde.

Sulfanilamid mit einer Löslichkeit von 0,7% bei 20° C und von 1,2% bei 37° C zeigte einen mittleren Höchstblutspiegelwert von 3,1 mg-% nach Ablauf von $1^1/_2$ Stunden nach der intraperitonealen Applikation. Die Sulfonamidharnausscheidung mit dem Höchstgipfel nach 2 Stunden (240 mg-%) und einem Höchstwert von 14 mg Sulfonamid in der Gesamtharnmenge von $1^1/_2$ Stunden war eine sehr ergiebige. Das Rückresorbat bewegte sich zwischen 85,5 und 51.5% und zeigte während der gewählten Zeitabschnitte fallende Tendenz ohne der Abnahme der Blutkonzentration parallel zu verlaufen, der Mittelwert betrug 70%. Weiterhin zeigte sich in diesem Versuch, daß der zunehmenden Sulfonamidblutkonzentration eine Vermehrung der Glomerulusfiltratmenge parallel geht, der nach $1^1/_2$ Stunden erreichte Höchstblutspiegelwert von 3,1 mg-% fällt mit dem Gipfel des Glomerulusfiltrates von 1,51 und dem Rückresorbatwert von 0,99 zusammen. Dem im Verlauf von $1^1/_2$ Stunden eintretenden Absinken der Rückresorption entspricht ein Ansteigen des Sulfanilamid-Glomerulusfiltrates während der gleichen Zeitspanne (Tabelle 1).

Tabelle 1.

Zeit	Harnmenge	Kreatinin					Sulfanilamid						
		Blut	Harn	Glomerulusfiltrat cm³ H_2O je Minute	Rückresorbat	RR	Blut im Mittel von 2 Analysen	Harn	in der Gesamtharnmenge	ausgeschieden je Minute	Glomerulusfiltrat	Rückresorbat	*RR*
Min.	cm³	mg-%	mg-%			%	mg-%	mg-%	mg	mg	mg		%
30	6	1,36	184	36,13	22,96	99,22	2,4	40	2,4	0,008	0,54	0,47	88,3
30	5	—	184	24,08	23,90	99,25	2,9	60	3,0	0,10	0,69	0,59	84,8
30	7	—	256	44,75	48,49	99,46	3,1	200	14,0	0,47	1,51	0,99	65,7
30	3	1,36	268	16,74	16,66	99,52	2,95	240	7,2	0,24	0,49	0,29	59,2
60	4	—	228	11,06	10,99	99,36	2,7	220	8,8	0,15	0,29	0,15	51,3

RR-Mittelwert = 70%

2. Versuch. Versuchstag 26. 7. 44; 1,0 g *Sulfathiazol* einem Rattler Nr. IV intraperitoneal injiziert.

Die Kurve der in kleinen Zeitabständen bestimmten Blutkonzentration des Sulfathiazol, das bei 20° C zu 0,6% und bei 37° C zu 0,9% in Lösung geht, zeigt einen langsamen, stetigen Anstieg ohne stärkere Kurvenschwankungen. Die höchste Konzentration in Blut und Harn ist nach 2 Stunden erreicht. Die Harnausscheidung sinkt in der dritten halben Stunde unter die vorhergehenden und folgenden Werte ab. Das Glomerulusfiltrat zeigt offenbar in Abhängigkeit von der Harnmenge seinen Höchstwert nach 2 Stunden. Das Rückresorbat des Filtrates schwankte zwischen 67 und 87%, das Mittel betrug 78%, so daß ein hohes Maß von Rückresorption vorliegt.

Aus der vergleichenden Betrachtung der wellenförmig verlaufenden Rückresorbatkurve des Sulfathiazol und der Darstellung der Abnahme und Zunahme des filtrierten und ausgeschiedenen Sulfathiazol ergibt sich, daß dem Anstieg des Rückresorbats ein Abfall des filtrierten und ausgeschiedenen Sulfathiazol und dem Absinken eine Zunahme parallel verläuft, der Zunahme der Sulfathiazolblutkonzentration entspricht eine sich zeitweise niedriger einstellende Rückresorption (Tabelle 2).

Tabelle 2.

eit	Harnmenge	Kreatinin					Sulfathiazol						
		Serum	Harn	Glomerulusfiltrat cm^3 H_2O je Minute	Rückresorbat	*RR*	Blut im Mittel von 2 Analysen	Harn	in der Gesamtharnmenge	ausgeschieden je Minute	Glomerulusfiltrat	Rückresorbat	*RR*
in.	cm^3	mg-%	mg-%			%	mg-%	mg-%	mg	mg	mg		%
30	1,5	0,98	530	27,39	27,34	99,82	2,2	160	2,4	0,08	0,60	0,52	86,6
30	1,5	—	500	25,51	25,47	99,84	2,35	350	5,25	0,17	0,57	0,40	69,9
30	0,75	—	520	13,26	13,24	99,84	2,65	270	2,02	0,07	0,35	0,28	80,5
30	2,5	0,98	455	38,53	38,45	99,79	2,75	420	10,50	0,35	1,04	0,69	67,2
60	3,5	—	440	26,04	25,98	99,76	2,75	350	11,52	0,19	0,72	0,61	85,7

RR-Mittelwert = 78%

3. Versuch. Versuchstag 3. 8. 44; 1,0 g *Sulfapyridin* einem grauen Wolfsbastard Nr. III intraperitoneal appliziert.

Das zu 0,03% bei 20° und 0,06% bei 37° C lösliche Sulfapyridin zeigt nach den festgestellten Mittelwerten der Blutkonzentration relativ stärkere Schwankungen mit einem Höchstgipfel 2 Stunden nach der intraperitonealen Applikation.

Die in der Gesamtharnmenge in der Zeit festgestellte Sulfapyridinmenge ist relativ geringer, der Höchstwert der Sulfapyridinausscheidung im Harn findet sich 2 Stunden nach der intraperitonealen Applikation. Entsprechend der großen Menge des 1 Stunde nach der intraperitonealen Applikation gewonnenen Katheterharns von 118 cm^3 waren zu diesem Zeitpunkt die Sulfapyridinmengen in der Gesamtharnmenge und in der Zeit sowie der Wert des Glomerulusfiltrates und Rückresorbates am höchsten. Das Rückresorbat schwankte zwischen 90 und 94%, im Mittel 92% (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Zeit	Harnmenge	Kreatinin					Sulfapyridin						
		Blut	Harn	Glomerulusfiltrat $cm^3 H_2O$ je Minute	Rückresorbat	*RR*	Blut im Mittel von 2 Analysen	Harn	in der Gesamtharnmenge	ausgeschieden je Minute	Glomerulusfiltrat	Rückresorbat	*RR*
Min.	cm^3	mg-%	mg-%			%	mg-%	mg-%	mg	mg	mg		%
30	20	1,37	100	48,17	47,51	98,42	2,25	10	2	0,066	1,08	1,01	93,9
30	118	—	132	378,72	374,72	98,96	2,2	20	23,6	0,786	8,33	7,54	90,5
30	6		224	32,70	32,50	99,38	2,3	34	2,04	0,068	0,75	0,68	91,2
30	2		408	19,64	19,57	99,64	3,1	67	1,34	0,044	0,61	0,56	94,0
60	4	—	216	10,56	10,43	98,6	2,9	41	1,64	0,027	0,30	0,28	90,0

RR-Mittelwert = 92%

4. Versuch. Versuchstag 31. 7. 44; 1,0 g *Sulfapyrimidin* einem Rattler Nr. VI intraperitoneal injiziert.

Das bei 20° C zu 0,015% und bei 37° C zu 0,03%, also schwer lösliche Sulfapyrimidin zeigt eine niedrige Blutkonzentration. Die höchste Konzentration im Blut wurde $^1/_2$ Stunde nach der intraperitonealen Applikation ermittelt, dann zeigte die Blutkonzentration fallende Tendenz.

Das Höchstmaß der Sulfapyrimidinausscheidung im Harn war nach $1^1/_2$ Stunden, der Maximalwert des Glomerulusfiltrates und des Rückresorbates nach $1^1/_2$ Stunden nachzuweisen.

Das Rückresorbat schwankte zwischen 60 und 73% mit einem Mittelwert von 68%, es fand sich mit wachsendem Abstand vom Zeitpunkt der intraperitonealen Applikation eine zunehmende Abnahme des Rückresorbatwertes. Das Absinken des Rückresorbates erfolgte parallel der Abnahme der Blutkonzentration (Tabelle 4).

Tabelle 4.

Zeit	Harnmenge	Kreatinin					Sulfapyrimidin						
		Blut	Harn	Glomerulusfiltrat $cm^3 H_2O$ je Minute	Rückresorbat	*RR*	Blut im Mittel von 2 Analysen	Harn	in der Gesamtharnmenge	ausgeschieden je Minute	Glomerulusfiltrat	Rückresorbat	*RR*
Min.	cm^3	mg-%	mg-%			%	mg-%	mg-%	mg	mg	mg		%
30	2	1,74	315	12,35	12,28	99,44	1,3	60	1,2	0,04	0,16	0,12	73
30	3	—	364	20,68	20,58	99,51	1,2	60	1,8	0,06	0,25	0,19	76
30	6	1,78	340	38,63	38,43	99,48	1,1	65	3,9	0,13	0,42	0,29	69
30	3	—	304	17,27	17,17	99,42	0,95	60	1,8	0,06	0,15	0,09	60
60	4	—	256	9,57	9,40	99,3	0,9	50	2,0	0,03	0,09	0,05	61

RR-Mittelwert = 68%

III. Vergleichende Betrachtung und Beurteilung der Versuchsergebnisse.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Bestimmung der Blutkonzentration der in 4 Einzelversuchen zur intraperitonealen Applikation beim Hunde verwendeten 4 Sulfonamide verschiedener Löslichkeit

kommt man zu der Feststellung, daß ihre Resorption aus dem Bauchfell in Abhängigkeit von ihrem Löslichkeitswert steht. Das am leichtesten lösliche Prontalbin zeigte die ausgiebigste und zeitlich schnellste Resorption, bereits der eine halbe Stunde nach der intraperitonealen Applikation ermittelte Wert des Blutspiegels übersteigt um 0,15 mg-% bis 1,1 mg-% die ermittelten Anfangswerte der Blutkonzentration der schwer und schwerstlöslichen Sulfonamide. Der Höchstgipfel des Sulfanilamidblutspiegels wird nach $1^1/_2$ Stunden, der des Sulfathiazol- und Sulfapyridinblutspiegels nach 2 Stunden erreicht. Die im Vergleich zu den besser löslichen Sulfonamiden sehr niedrigen Blutspiegelwerte des am schwersten löslichen Sulfapyrimidin zeigen, nachdem der Höchstgipfel schon eine halbe Stunde nach der intraperitonealen Applikation des Sulfapyrimidin sich einstellt, einen fortlaufend langsamen Abfall.

Die Stärke und die Schnelligkeit der Sulfonamidresorption aus dem Bauchfell dürfte entsprechend der Höhe und dem Zeitpunkt der ermittelten Werte der Sulfonamidblutkonzentration in Abhängigkeit von der Löslichkeit des einzelnen Sulfonamid stehen. Die höchsten Schwankungen des Blutspiegelwertes in den innerhalb der Zeitintervalle von 30 bzw. 60 Min. entnommenen Blutproben finden sich beim Sulfapyridin (mittlere Schwankungsbreite 0,34 mg-%), die niedrigsten beim Sulfapyrimidin (mittlere Schwankungsbreite 0,1 mg-%), die Blutkonzentration schwankte im Mittel um 0,27 mg-% beim Sulfanilamid und im Mittel um 0,14 mg-% beim Sulfathiazol.

Aus dem Verlauf der Sulfonamidharnausscheidung wird ersichtlich, daß die leichter löslichen Sulfonamide (Sulfanilamid und Sulfathiazol) hohe Ausscheidungswerte zeigen. Die niedrige Ausscheidung des Sulfanilamid im Harn im Verlauf von 1 Stunde nach der intraperitonealen Applikation schnellt $1^1/_2$ Stunden später zu hohen Ausscheidungswerten empor; diese hohe Ausscheidung bleibt bis zum Versuchsende nach $3^1/_2$ Stunden erhalten. Die Harnausscheidung des Sulfathiazol ist fortlaufend von der ersten Versuchsstunde an eine hohe.

Der Höchstwert der Sulfanilamidmenge im Gesamtharn findet sich nach $1^1/_2$ Stunden, der der Sulfathiazolmenge nach $2^1/_2$ Stunden; beim Sulfanilamidversuch folgt dem Abfall der Kurve in der zweiten Versuchsstunde ein neuer Anstieg nach $2^1/_2$ Stunden.

Im Gegensatz zu den relativ hohen Ausscheidungswerten der leichter löslichen Sulfonamidpräparate im Harn ist die Abgabe der schwer löslichen Substanzen Sulfapyridin und Sulfapyrimidin durch den Harn geringer, das während der Versuchsdauer von $3^1/_2$ Stunden in der Gesamtharnmenge ausgeschiedene Sulfonamid ist bei dem besser löslichen Sulfapyridin größer als bei dem schlechter löslichen Sulfapyrimidin.

Ein Vergleich der Harnausscheidungsverhältnisse der vier intraperitoneal applizierten Sulfonamide während einer Versuchszeitdauer von $3^1/_2$ Stunden ergibt folgendes Bild:

Die Menge der im Gesamtharn ausgeschiedenen Sulfonamidverbindung steht mit Ausnahme des Sulfapyridins in Abhängigkeit von ihrer Löslichkeit. Das nachstehende Kurvenbild zeigt die Gesamtausscheidung der vier verschieden löslichen Sulfonamide im Harn während

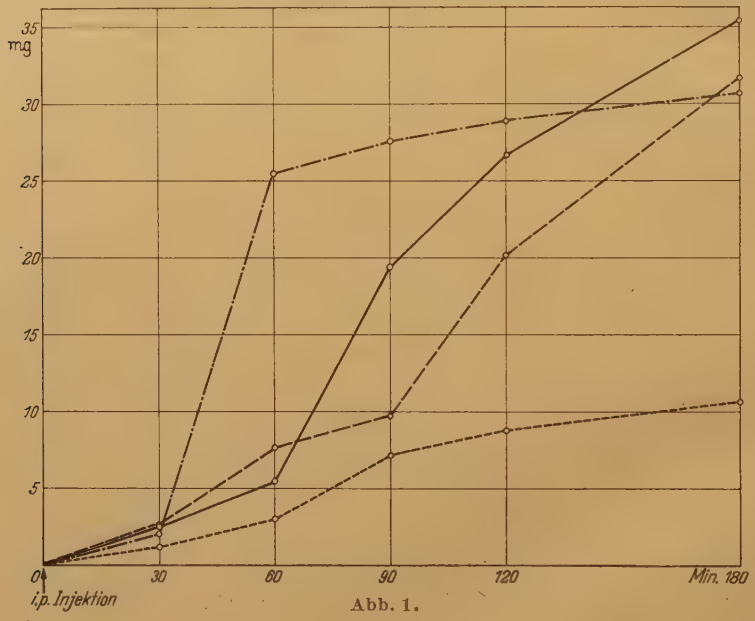


Abb. 1.

einer Versuchszeit von 3 Stunden; die in der Zeit ausgeschiedenen Substanzmengen von Sulfanilamid, Sulfathiazol und Sulfapyrimidin zeigen die gleiche Reihenfolge wie ihre Löslichkeit.

Auch die Stärke des Glomerulusfiltrates und des Rückresorbates ist von der Löslichkeit abhängig, die leichter löslichen Substanzen Sulfanilamid und Sulfathiazol zeigen einen höheren Wert des Glomerulusfiltrates und des Rückresorbates im Verlauf der $3^1/_2$stündigen Versuchszeit. Das Sulfapyridin nimmt eine Sonderstellung ein.

Die von M. Sekula bereits früher mitgeteilte Beobachtung, daß die hohe Konzentration eines im Blut enthaltenen Stoffes (Sulfonamid) nach der intravenösen Injektion durch eine sich niedriger einstellende Rückresorption entfernt wird und daß beim Absinken der Blutkonzentration ein entsprechender Anstieg der Rückresorption die Folge ist, fand sich auch bei der tierexperimentell vorgenommenen intraperitonealen Applikation der Sulfonamide im wesentlichen

bestätigt. Das Rückresorbat steigt oder sinkt jedoch parallel mit der ab- oder zunehmenden Blutkonzentration.

Die Tabelle 5 veranschaulicht die Beziehungen zwischen Sulfonamidlöslichkeit, Stärke der Glomerulusfiltration und des Rückresorbates sowie die Abhängigkeit des Rückresorbates von der Blutspiegelhöhe.

Tabelle 5.

Substanz	Glomerulusfiltratwert in $3^1/_2$ Versuchsstunden	Mittelwert	Rückresorbatwert in $3^1/_2$ Versuchsstunden	Mittelwert	Rückresorbat in $3^1/_2$ Versuchsstunden %	Mittelwert	Blutspiegelwert in $3^1/_2$ Versuchsstunden	Mittelwert
Sulfanilamid	3,52	0,74	2,49	0,5	349,3	70	14,05	2,81
Sulfathiazol	3,28	0,65	2,50	0,5	389,9	78	12,50	2,50
Sulfapyridin	11,07	2,21	10,07	2,0	459,6	92	12,75	2,55
Sulfapyrimidin . . .	1,07	0,21	0,74	0,15	339,0	68	5,45	1,90

In Übereinstimmung mit der von M. Sekula beim Versuch am Menschen getroffenen Feststellung war auch nach der intraperitonealen Applikation des Sulfapyridin im Tierversuch die Gesamtausscheidung durch den Harn am niedrigsten (vgl. Tabelle 6), sie wurde bedingt durch die sehr hohe Rückresorption (Mittelwert des Rückresorbates 92%).

Tabelle 6. *Gesamtausscheidung von 1,0 g in 50 cm³ physiologischer Kochsalzlösung während einer Versuchszeit von $3^1/_2$ Stunden.*

Substanz	Gesamtharnmenge cm³	Gesamtharnmenge mg	Mittelwert	Ausgeschieden je Minute mg	Mittelwert	Mittelwert bei Blutkonzentration beträgt mg-%
Sulfanilamid . .	25	35,40	7,08	1,041	0,208	2,81
Sulfathiazol . .	9,75	33,42	6,68	0,770	0,150	2,50
Sulfapyridin . .	150	31,62	6,40	0,991	0,200	2,55
Sulfapyrimidin	18	10,70	2,14	0,320	0,064	1,40

Infolge der geringen Ausscheidung und der hohen Rückresorption kommt im menschlichen Organismus ein hoher Prozentsatz des Sulfapyridin durch Azetylierung zur Entgiftung, bereits 1 Stunde nach der intravenösen Injektion läßt sich im menschlichen Harn azetyliertes Sulfapyridin nachweisen.

Bei Gegenüberstellung der früheren im Versuch am Menschen erzielten Ergebnisse über Resorption und Ausscheidung flüssiger Sulfonamidderivate nach intravenöser Injektion (M. Sekula) zu den im Tierversuch ermittelten Resorptions- und Ausscheidungsverhältnissen nach intraperitonealer Applikation mehrerer in physiologischer Kochsalzlösung suspendierter Sulfonamide verschiedener Löslichkeit kommt man zu folgenden Ergebnissen:

1. Entsprechend der hohen Aufsaugkraft des Peritoneums infolge seiner erheblichen Flächenausdehnung (Wegener, Orator) erfolgt eine schnelle und ausgiebige Resorption und Ausscheidung der Sulfonamidderivate, die jedoch in Abhängigkeit von der Sulfonamidlöslichkeit steht.

2. Das relativ geringere Ausmaß von Resorption aus dem Bauchfell und von Ausscheidung durch den Harn der schwer löslichen Sulfonamidderivate verspricht vielleicht einen erhöhten lokalbakteriostatischen Sulfonamideffekt im Bauchraum.

3. Nach intraperitonealer Applikation von Sulfonamid verläuft Absinken und Ansteigen des Rückresorbates im allgemeinen parallel der Ab- und Zunahme der Blutkonzentration.

Zusammenfassung.

Es wird über die Ergebnisse der Prüfung der Ausscheidung von vier verschiedenartig löslichen Sulfonamiden (Sulfanilamid, Sulfathiazol, Sulfapyridin, Sulfapyrimidin) aus dem Bauchfell in Vergleich zur Blutkonzentration und über die damit verbundene Bestimmung der Nierenfunktion an Hand der Kreatininmethode berichtet. Die Schnelligkeit und die Stärke der Resorption der Sulfonamide aus dem Bauchfell steht in Abhängigkeit von ihrem Löslichkeitswert, eine erhöhte Konzentration der peritoneal resorbierten Sulfonamide im Blut wird durch eine Erniedrigung der Rückresorption ausgeglichen, die prozentuelle Rückresorption der Sulfonamide verläuft im allgemeinen parallel der Sulfonamidblutspiegelhöhe. Das schwerer lösliche Sulfapyridin wurde in gleicher Weise wie nach intravenöser Injektion auch nach intraperitonealer Applikation durch den Harn in geringem Ausmaß ausgeschieden und in sehr hohem Grad rückresorbiert. Auf Grund der Ergebnisse der Prüfung der Ausscheidungsverhältnisse (Glomerulusfiltration und Rückresorption) von intraperitoneal applizierten Sulfonamiden konnte festgestellt werden, daß das Entharnungsvermögen (Clearance) der Nieren für die Sulfonamide verschiedener Löslichkeit im wesentlichen das gleiche ist, wie für die intravenös verabreichten Sulfonamidlösungen.

Die Tierversuche wurden im Jahre 1944 ausgeführt, ihre Ergebnisse konnten aus zeitbedingten Umständen nicht früher bekanntgegeben werden.

Literatur.

Oesterheld, G. u. J. Druey: Helvet. chim. Acta **25**, 753 (1942). — Orator, V.: Pathologisch-physiologische Grundlagen der Chirurgie, Heft 3, Darm- und Bauchfell. Leipzig 1939. — Popper, Mandel u. Meyer: Biochem. Z. **29**, 354 (1937). — Rehberg: Biochem. Z. **20**, 461, 477 (1926). — Rein, H.: Physiologie des Menschen, 7. Aufl. Berlin 1943. — Sekula, Maria: Z. klin. Med. **142**, 221 (1943). — Wegener, G.: Arch. klin. Chir. **20**, 51 (1876).

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik und dem Pharmakologischem Institut der Universität Berlin.

Über die Kreislaufwirkung des Strychnins.

Von

Hans Zettel, Emden.

(Eingegangen am 7. Mai 1948.)

Anläßlich von Untersuchungen über die Behandlung des Kreislaufkollapses sollte auch das Strychnin zu entsprechenden Versuchen mitbenutzt werden. Die Verwendung des Strychnins lag nahe, da seine blutdrucksteigernde Wirkung fast allgemein anerkannt ist (wenigstens unter bestimmten Voraussetzungen) und vor allem die innere Klinik über gute Erfahrungen mit Strychnin bei der Behandlung postinfektiöser Kollapszustände immer wieder berichtet hat. Ein weiterer Grund für die Anwendung des Strychnins war, daß nach dem Arbeitsplan ein Präparat mit langdauernder Wirkung gesucht werden sollte und in dem Strychnindepotpräparat Movellan ein Mittel vorhanden zu sein schien, das unseren Absichten entgegenkam.

Die zunächst nur zu Orientierungszwecken durchgeführten Versuche an Hunden zeigten jedoch, daß das Strychnin fast nie eine Blutdrucksteigerung bewirkte oder höchstens nur dann, wenn Strychnin in krampfauslösender Dosierung gegeben wurde. Es wurde deshalb in 20 Versuchen an Hunden und 3 Versuchen an Katzen die Strychninwirkung näher untersucht [1].

Die Versuche an Hunden wurden in Morphin-Pernoctonnarkose (4 Fälle), in Morphin-Chloralosenarkose (12 Fälle) oder in Lokalanästhesie nach Morphinvorbereitung (4 Fälle) durchgeführt, die Versuche an Katzen in Urethannarkose.

In 2 Versuchen mit unbeeinflußtem Blutdruck kam es 2mal zu geringfügigen, nicht sicher verwertbaren Blutdrucksteigerungen nach Eintritt gesteigerter Reflexerregbarkeit bzw. nach Beginn der Krämpfe. In 6 Versuchen wurde der Blutdruck durch Dauerinfusion von Azetylcholin gesenkt. In 5 dieser Fälle blieb der Blutdruck nach Strychnin unverändert, auch nach krampfauslösenden Dosen. In einem Fall kam es zusammen mit dem Krampfbeginn zu einem deutlichen Blutdruckanstieg, der auch nach 0,5 g Chloralhydrat intravenös nicht wieder abfiel. Bei 9 Versuchen wurde Movellan benutzt, davon wurde in 4 Fällen die Krampfauslösung durch Curare verhindert. Hiernach kam es nur in einem Fall (Mo-Chloralosenarkose, Vorbereitung mit Curare, künstliche Atmung, Blutdrucksenkung durch Dauerinfusion von 2 mg/Min. — insgesamt 64 mg —

[1] Die Tierversuche wurden im Jahre 1943 durchgeführt; Herrn Prof. Heubner bin ich für seine Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Die Blutdruckkurven sind durch die Kriegseinflüsse verlorengegangen. Doch erscheinen die Versuche wegen ihrer Ergebnisse auf Grund der noch vorhandenen Protokolle trotzdem mitteilenswert.

Azetylcholin) während der Infusion von Azetylcholin zu einem langsamen aber stetigen Blutdruckanstieg bis zur Ausgangshöhe. Der Venendruck blieb auch in diesem Versuch unverändert. Eine wesentliche Steigerung des Venendruckes kam höchstens während der Strychninkrämpfe zur Beobachtung und war dann schwer zu beurteilen, einmal auch ein erheblicher Abfall. Die Movellanversuche an dekapitierten Katzen zeigten keine deutliche Blutdruckwirkung, weder bei unbeeinflußtem noch bei gesenktem Blutdruck.

Die 23 Versuche ergaben also nur 2mal bei unbeeinflußtem Blutdruck eine unwesentliche Blutdrucksteigerung nach Strychnin. nitr. Bei künstlich gesenktem Blutdruck kam es nur einmal zu einer Blutdrucksteigerung nach Movellan und einmal nach Strychnin. nitr. Außerdem war die geringe Beeinflussung des Venendrucks auffallend.

Erwähnenswert ist noch, daß die Strychnindosen, die zur Erreichung gesteigerter Reflexerregbarkeit bzw. zur Auslösung von Krämpfen nötig sind, innerhalb weiter Grenzen schwanken. Bei einem 22,4 kg (!) schweren Hund kam es schon nach insgesamt 0,05 mg Strychnin. nitr. intravenös zu stark gesteigerter Reflexerregbarkeit. Ein 9,0 kg schwerer Hund zeigte dagegen nach 0,5 mg keinerlei Strychninwirkung. Das gleiche zeigte sich etwa bei Movellan. Im allgemeinen kam es nach 0,4—0,5 mg/kg Movellan zu gesteigerter Reflexerregbarkeit. Ein 32,4 kg schwerer Hund bekam nach 10,0 mg Movellan schwere Krämpfe. Die Movellanwirkung setzte bei subkutaner Verabreichung meist nach 20—40 Min. ein. Zu berücksichtigen ist, daß die meisten Tiere wegen der Schwierigkeiten in der Futterbeschaffung nicht in gutem Zustand waren. Die großen Unterschiede in der Strychninwirkung sind sicher zum Teil hierdurch bedingt.

Die Durchsicht der Literatur ergab, daß die in den Lehrbüchern meist von S. MAYER übernommene Ansicht der hochgradigen Blutdrucksteigerung nach Strychnin nicht immer nachgewiesen werden konnte. STROSS konnte im einfachen Blutdruckversuch keine wesentliche Wirkung feststellen. Die Blutdruckerhöhung trat deutlich nur dann ein, wenn neben Curare eine tiefe, den Blutdruck herabsetzende Urethannarkose durchgeführt wurde. Auch JUNKMANN und STROSS konnten keine wesentliche blutdrucksteigernde Wirkung feststellen. Bei weitgehend gelähmtem Vasomotorenzentrum ließ sich eine Blutdrucksteigerung geringen Grades, aber auch dann nicht regelmäßig nachweisen. Nach MEYER kommt es immer dann zu einer dauernden Blutdrucksteigerung, „wenn die Reflexerregbarkeit der motorischen Zentren des Rückenmarks einen gewissen Grad erreicht hat". Auch bei Unterdrückung der Krämpfe durch Curare kommt es nach MEYER zu periodisch wiederkehrenden Blutdrucksteigerungen mit Pulsverlangsamung, die als Folge gesteigerter Erregbarkeit der vasomotorischen Zentren und des Vaguszentrums aufgefaßt werden. Auch nach Halsmarkdurchschneidung soll eine Blutdrucksteigerung — wenn auch geringen Grades — vorhanden sein, was als Beweis für die Existenz akzessorischer vasomotorischer Apparate im Rückenmark angesehen

wird (Langley, Meyer). Über die Beeinflussung des Vaguszentrums und des Herzens durch Strychnin sind die Angaben in der Literatur sehr widersprechend. Es wird sowohl über Vaguserregung als auch über Vaguslähmung berichtet (Kisch). Am Herzen ist sowohl günstige Beeinflussung der geschädigten Überleitung (v. Egmond) oder Verminderung heterotoper Reizbildungen (Wenckebach) beobachtet worden als auch komplette Dissoziation der Vorhofs- und Kammertätigkeit (Yamada).

An gesunden Menschen sind nur wenige Versuche durchgeführt worden. Liljestrand und Nylin fanden keine wesentliche Veränderung von Blutdruck und Pulsfrequenz. In kreislaufanalytischen Untersuchungen an gesunden Menschen fanden Wezler und Böger dagegen eine Blutdrucksenkung (vor allem des diastolischen Drucks) bei praktisch gleichbleibender Pulsfrequenz mit Abnahme des elastischen und peripheren Widerstandes und einer Erhöhung des Minutenvolumens, die im wesentlichen durch Vergrößerung des Herzschlagvolumens bedingt war. Einige eigene kreislaufanalytische Versuche[1] am Gesunden hatten ein ähnliches Ergebnis (als Beispiel vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1. *Strychninversuch.*

	Mittl. Blutdruck %	Pulsfrequenz %	Schlagvolumen %	Min.-volumen %	Elastischer Widerstand %	Peripherer Widerstand %	Herzarbeit %	Herzleistung %
30 Sek. p. inject.	− 1	− 2	+ 38	+ 36	− 3	− 38	+ 35	+ 34
1 Min. „	− 1	+ 6	+ 18	+ 15	+ 5	− 32	+ 6	+ 12
1 Min. 40 Sek. „	− 3	− 2	− 12	− 13	− 5	− 22	− 14	− 15
2 Min. 45 Sek. „	− 3	− 2	− 4	− 2	− 3	− 22	− 6	− 4
5 Min. 20 Sek. „	− 3	+ 5	+ 23	+ 29	− 12	− 48	+ 20	+ 25

23jährige gesunde Vp. 1 mg Strychnin. nitr. intravenös. Die Veränderungen sind in Prozentzahlen im Vergleich zum Ruhewert angegeben. — Ob die nochmalige starke Verminderung des elastischen und peripheren Widerstandes mit erneuter Vergrößerung von Schlag- und Minutenvolumen 5 Min. 20 Sek. nach der Injektion noch als reine Strychninwirkung anzusehen ist, ist fraglich. Auffallend ist die nachhaltige Beeinflussung des peripheren Widerstandes, während die günstige Beeinflussung des Herzvolumens und der Herzleistung nur von geringer Dauer ist und sogar von einer Periode der Verschlechterung der wesentlichen Kreislaufgrößen gefolgt wird.

Wezler glaubt, daß es sich um eine reine Gefäßreaktion im Sinne einer Erschlaffung der glatten Muskulatur handelt mit Herabsetzung des peripheren Widerstandes, die zu einem vermehrten Blutangebot an das Herz und zur Schlagvolumenvergrößerung führt. Eine große

[1] Für die freundliche Unterstützung danke ich auch an dieser Stelle Herrn Doz. H. Reichel herzlich.

Rolle spielt dabei sicher auch die nach Strychnin nachgewiesene Erhöhung des Muskeltonus als Folge des erhöhten Tonus der Rückenmarkszentren, die eine Verstärkung des venösen Rückflusses zum Herzen bewirkt (HENDERSON). Damit dürfte auch die behauptete günstige Herzwirkung des Strychnins zu erklären sein. Bei einer wesentlichen Erhöhung des Muskeltonus müßte man allerdings auch mit einer Venendrucksteigerung rechnen. Diese wurde bei unseren Versuchen meist vermißt. Bei der geringen Zahl der entsprechenden Versuche ist dem keine große Bedeutung beizumessen.

Die allgemeine bisherige Ansicht über die Strychninwirkung geht also dahin, daß Strychnin über einen von vasomotorischen Zentren ausgelösten Gefäßkrampf eine Blutdrucksteigerung bewirkt (POULSSON). Die Untersuchungen von STROSS, JUNKMANN und STROSS und eigene Versuche zeigen jedoch, daß Strychnin in nicht krampfmachenden Dosen den Blutdruck nicht wesentlich beeinflußt. Selbst nach krampfauslösenden Dosen, bei Anwendung von Curare oder bei künstlich gesenktem Blutdruck ist nur selten eine wesentliche Blutdruckwirkung nachweisbar. Auch die erwähnten Versuche am Menschen zeigen keine verwertbare Beeinflussung des Blutdrucks oder der Pulsfrequenz. Diese Versuche machen es außerdem wahrscheinlich, daß die Annahme einer Kreislaufwirkung durch zentral vasomotorisch bedingten Gefäßkrampf nicht zutrifft. Die günstige Beeinflussung von Herz und Kreislauf scheint vielmehr durch ein vermehrtes Blutangebot an das Herz bedingt zu sein. Als Ursache hierfür kommt eine Erschlaffung der Gefäßmuskulatur mit Herabsetzung des peripheren Widerstandes und eine Erhöhung des Muskeltonus als Folge der Strychninwirkung in Frage.

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß das Strychnin als Kollapsmittel, wobei es neben der Auffüllung des Gefäßsystems auf eine Erhöhung des Blutdrucks ankommt, wenig geeignet ist. Dagegen wird die Strychninanwendung bei infektiös bedingten Kreislaufschäden als Tonikum von Vorteil sein.

Zusammenfassung.

In 23 Versuchen an Hunden und Katzen wurde die Wirkung des Strychnins auf den Blutdruck untersucht. Dabei ergab sich, daß Strychnin in therapeutischen Dosen keinen wesentlichen Einfluß auf den Blutdruck hat. Auch bei krampfmachender Dosierung und besonderen Versuchsbedingungen (Curare, künstlich gesenkter Blutdruck) ist eine wesentliche Blutdruckerhöhung selten.

Auch Versuche am Menschen hatten ein ähnliches Ergebnis. Sie zeigen außerdem, daß die bisherige Annahme einer Strychninwirkung

über einen vasomotorisch bedingten Gefäßkrampf wahrscheinlich nicht richtig ist. Eine günstige Beeinflussung des Kreislaufs durch Strychnin kommt wahrscheinlich durch ein vermehrtes Blutangebot an das Herz zustande.

Literatur.

Egmond v.: Zit. nach Kisch. — Henderson, Y.: Atmung. Leipzig 1941. — Junkmann, K. u. W. Stross: Arch. exper. Path. (D.) **131**, 1 (1928). — Kisch, B.: In Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. VII/1, S. 712. — Langley, J. N.: J. Physiol. (Brit.) **53**, 120, 147 (1919). — Liljestrand, G. u. G. Nylin: Ref. Ber. Physiol. **124**, 655 (1941). — Mayer, S.: Wien. S.ber.Akad. **54** (1871). — Meyer, H. H.: Experimentelle Pharmakologie, 9. Aufl. Berlin-Wien 1936. — Poulsson, E.: In Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II/1. Berlin 1929. — Stross, W.: Arch. exper. Path. (D.) **131**, 18 (1928). — Wenckebach: Zit. nach Kisch. — Wezler, K. u. A. Böger: Erg. Physiol. **41**, 292 (1939). — Yamada: Zit. nach Kisch.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens).

Bluthistaminspiegel und örtliche Erfrierung.

Von

Heim Ziemke.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. Juni 1948.)

Für die Entstehung der Folgen lokaler Kälteeinwirkung wird — abgesehen von direkter, zur Nekrose führender Schädigung durch Gefrieren des der Kälte ausgesetzten Gewebes — wohl mit Recht die während und vor allem nach der Kälteeinwirkung bestehende Hypoxämie im erfrierenden und anschließenden proximalen Gebiet verantwortlich gemacht. Die anatomischen Verhältnisse sind oft beschrieben und gut bekannt (Siegmund, Staemmler). Exakte Untersuchungen über den Gewebsstoffwechsel sind — wie Staemmler betont — recht gering. Schade sieht in der Verschiebung des Kolloidzustands zur grobdispersen Phase (Gelose) die Ursache zur späteren Nekrose des Gewebes. Pyro und Siegmund machen die Folgen des Erstickungsstoffwechsels mit Stase, Permeabilitätsänderung der Gefäße und seröser Entzündung hierfür verantwortlich. Daneben wird besonders von Siegmund dem Auftreten von gefäßwirksamen Aminen eine bedeutsame Rolle zugeschrieben. Loos hat — soweit mir bekannt — bisher als Einziger im Serum von Erfrierungsblasen einen 3—4mal höheren Histamingehalt als im normalen Blut festgestellt. Lang, Schöttler, Schütte, Schwiegk und Westphal konnten bei ihren Versuchen hingegen besondere Stoffwechselprodukte im Venenblut abgekühlter Hinterbeine des Hundes nicht feststellen.

Wir haben versucht, durch Vergleich des Bluthistaminspiegels vor, während und nach lokaler Kälteeinwirkung am Kaninchen zur Frage des Auftretens von Histamin oder histaminähnlichen Stoffen im kältegeschädigten Gebiet Stellung zu nehmen. Die Versuchsanordnung war folgende: Die lokale Kälteeinwirkung erfolgte durch 15minutige Einwirkung von CO_2-Schnee auf ein Kaninchenohr. Der Bluthistaminspiegel wurde direkt vor und nach der Kälteeinwirkung sowie bei einzelnen Tieren 3, 24, 30, 46 und 74 Stunden nach Auftauen des Ohrs bestimmt. Daneben wurde in 3 Fällen der Histamingehalt der Ödemflüssigkeit aus Blasen und Gewebe des erfrorenen Ohrs festgestellt. Die Blutentnahme (5 cm^3) erfolgte aus der Vene des ungefrorenen Ohrs oder durch Herzpunktion. Das Blut wurde nach der Codeschen

Methode zur Histaminbestimmung verarbeitet. Die Auswertung geschah in der üblichen Weise am Meerschweinchenileum in atropinisierter Ringerlösung. Um einen *ungefähren* Überblick über den Histamingehalt der Blutextrakte des jeweiligen Versuchstieres zu erlangen, wurden der Badeflüssigkeit des Meerschweinchenileums gleiche Mengen der verschiedenen Extrakte zugefügt und miteinander verglichen. Als Beispiel sei eine der typischen Kurven hier abgebildet.

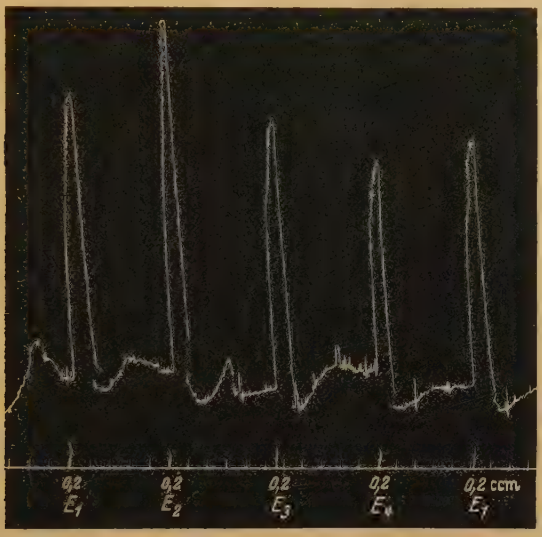


Abb. 1. Auswertung der Blutextrakte eines Kaninchens am Meerschweinchendarm bei lokaler Kälteeinwirkung (Kaninchen 1). E_1 Blutextrakt vor dem Frieren, E_2 Blutextrakt sofort nach Beendigung der Kälteeinwirkung, E_3 Blutextrakt 3 Stunden nach dem Frieren, E_4 Blutextrakt 24 Stunden nach dem Frieren.

Genaue Werte der Zu- oder Abnahme des Bluthistamins in den nach Erfrierung gewonnenen Extrakten verglichen mit der Histaminmenge im Blut vor dem Frieren erhielten wir dadurch, daß wir durch Austesten diejenige Menge eines jeden nach dem Frieren hergestellten Extraktes ermittelten, die am Meerschweinchendarm eine ebensolche Kontraktion wie eine bestimmte gleichbleibende Menge des vor dem Frieren gewonnenen Blutextrakts hervorrief. Die Versuchsergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben, die den Histamingehalt der einzelnen Extrakte bezogen auf den Normalhistamingehalt vor dem Frieren (als 1) registriert.

Die Auswertung der Tabelle zeigt, daß es bei 4 Versuchstieren direkt nach dem Frieren, d. h. nach Aufhören der Kälteeinwirkung durch den CO_2-Schnee, zu einer deutlichen Vermehrung des Bluthistamins kommt, während bei 2 Tieren eine unbedeutende Abnahme zu verzeichnen ist. Der Durchschnitt ergibt eine Steigerung von rund

Tabelle 1. *Relativer Histamingehalt im Kaninchenblut bei lokaler Kälteeinwirkung.*

Zeitpunkt der Blutentnahme	Kaninchen 1	2	3	4	5	6	Durchschnitt
Direkt nach Frieren . . .	1,75	2,0	0,73	2,5	0,83	1,43	1,54
3 Stunden nach Frieren .	0,9	1,6		–			1,25
24 Stunden nach Frieren .	0,7	2,4		–	–		1,33
30 Stunden nach Frieren .	–		-	0,9	–		0,9
46 Stunden nach Frieren .	–	-	-		–	1,1	1,1
74 Stunden nach Frieren .		–	0,96		–	–	0,96
Ödemflüssigkeit	0,093	–	0,3	–	–	0,4	0,26

50%. Der weitere Verlauf der Bluthistaminkurve scheint sich — soweit bei der geringen Zahl der Versuche eine Deutung zulässig ist — allmählich dem Normalwert anzugleichen. Im Serum der Erfrierungsblasen, das sofort nach Ausbildung der Blasen gewonnen wurde, stellten wir im Gegensatz zu Loos einen etwa 4mal kleineren Histaminanteil fest als im Körperblut. Uns scheint nicht allein die wahrscheinliche Vermehrung des Histamins oder der H-Stoffe im Blut an sich, sondern der Zeitpunkt ihres Auftretens bedeutungsvoll. Da unsere „direkt nach dem Frieren" erfolgten Blutentnahmen zu einem Zeitpunkt geschahen, wo die Einwirkung des CO_2-Schnees gerade beendet war und das Ohr sich noch völlig in der Kälteischämie befand, können wir aus unseren Ergebnissen folgern, daß schon *während* der Kälteeinwirkung die gefäßwirksamen Amine im geschädigten Gebiet freiwerden und daß zweitens die Blutzirkulation auch während starker Kälte nicht völlig aufgehoben ist, da anderenfalls das Auftreten von vermehrten H-Stoffen im Blut nicht recht erklärbar wäre.

Staemmler ist auf Grund experimenteller Untersuchungen schon früher zu dem gleichen Ergebnis gekommen. An dieser Stelle dürfen Untersuchungen, die zur gleichen Zeit wie die eigenen im Kieler Institut von Kahmann durchgeführt wurden, erwähnt werden, die auf anderen Wegen zu ähnlichen Resultaten führten. Kahmann untersuchte den Einfluß der örtlichen Kälteeinwirkung auf die Gerinnungszeit des strömenden Blutes am Kaninchen. Er fand — ebenso wie Mantscheff — nach lokaler Erfrierung eine erhebliche Verkürzung der Blutgerinnungszeit und zwar schon — hier im Gegensatz zu Mantscheff — kurz nach Beginn der Kälteeinwirkung.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen führt unseres Erachtens zu einer Annahme, auf die, wie wir glauben, viel zu wenig hingewiesen wurde, daß nämlich die Folgen der örtlichen Kälteeinwirkung eine Erkrankung des *gesamten* Organismus darstellt, die sehr wohl mit anatomisch nachweisbaren Schädigungen der inneren Organe einhergehen kann. Uns ist in diesem Zusammenhang nur eine Arbeit von Franz bekannt, der einen nach mehrmaligen leichten Erfrierungen des Gesichts und der Hände aufgetretenen Todesfall beschreibt. Die Sektion ergab ähnliche Befunde, wie sie Zinck bei Verbrennungen

fand, im wesentlichen also die Zeichen der serösen Entzündung der inneren Organe. Als Ausdruck der Gewebsschädigung konnten Barsoum und Gaddum bei der Verbrennung einen erhöhten Bluthistaminspiegel und Ewig eine verkürzte Blutgerinnungszeit feststellen. Die Vermehrung der H-Stoffe im Blut und die verkürzte Blutgerinnungszeit scheinen uns ganz allgemein als Ausdruck der serösen Entzündung Eppingers aufzufassen zu sein.

Auch bei anderen äußeren Schädigungen (posttraumatischem Schock, postoperativen Thrombosen, aseptischen Muskelnekrosen, Einwirkung von heißem Wasser, Sublimat und Phenollösung) ist das Freiwerden von H-Stoffen bekannt oder wahrscheinlich. Bei allen diesen Befunden scheint es sich um eine der gesetzmäßigen Reaktionen des Körpers (pathische Grundreaktion Siegmunds) auf äußere Einwirkungen verschiedener Genese zu handeln.

Literatur.

Bachmann, H.: Arch. exper. Path. (D.) **190**, 343 (1938). — Böttcher, H.: Virchows Arch. **312**, 464 (1944). — Dale u. Gaddum: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig: Georg Thieme 1936. — Franz, G.: Virchows Arch. **315**, 708 (1948). — Kahmann, A.: Inaug.-Diss. Kiel 1943. — Killian, H.: Zbl. Chir. **45**, 1763 (1942). — Kohler, O.: Zbl. Chir. **45**, 1782 (1942). — Lang, Schöttler, Schütte, Schwiegk u. Westphal: Klin. Wschr. **1943**, 444. — Loos, H. O.: Zbl. Chir. **10**, 449 (1941). — Münch. med. Wschr. **1943**, 155. — Mantscheff: Bruns' Beitr. **174**, 337 (1943). — Schade: Z. exper. Med. **7**, 275 (1919). — Siegmund, H.: Arch. Derm. **184**, 34 (1942). — Münch. med. Wschr. **1942**, 827. — Staemmler, H. J.: Virchows Arch. **312**, 437 (1944). — Staemmler, M.: Zbl. Chir. **45**, 1757 (1942). — Virchows Arch. **312**, 501 (1944). — Die Erfrierung. Leipzig: Georg Thieme 1944. — Zinck, K. H.: Veröff. Konstit.- u. Wehrpath. **46** (1940).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.

Über die Hemmung der Acetylcholinkontraktur des Froschrectus durch Gravitol.

Von

Kl. Soehring und H. Wiedow*.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Juni 1948.)

I.

Gravitol (Diäthylaminoäthyläther des 2-Methoxy-6-allylphenols) wurde 1928 von Eichholtz[1] zur therapeutischen Anwendung als secaleartiges Uterinum empfohlen. Seitdem war es Gegenstand mehrfacher Untersuchungen.

Über seine pharmakologischen Wirkungen wurden die folgenden Ergebnisse experimenteller Untersuchungen gefunden:

a) Glatte Muskulatur: Am isolierten Uterus des Meerschweinchens erhielten Käer und Barkan[2] mit niedrigen Konzentrationen von Gravitol überwiegend Erregung, mit hohen Konzentrationen nur Erschlaffung des Organs. In einer Übergangszone von $1—2 \cdot 10^{-6}$ wurden beide Effekte nebeneinander, bisweilen sogar am gleichen Präparat bei aufeinanderfolgenden Applikationen beobachtet. Die erregende Wirkung von Adrenalin auf den Uterus wurde durch Gravitol umgekehrt. Nicht ganz so deutlich, aber in die gleiche Richtung weisend waren die Ergebnisse an Kaninchen- und Katzenuteri. Am Meerschweinchenuterus in situ war die gleiche Unsicherheit in der Wirkungsrichtung zu beobachten, jedoch herrschte Erregung vor. Der beobachtete Effekt war von derselben Art, wie er auch durch Adrenalin hervorgerufen wurde. Eine Wirkungsumkehr durch Ergotamin fand jedoch nicht statt. Das Phänomen der Adrenalinumkehr durch Gravitol zeigte sich am Uterus in situ nicht.

Am isolierten Katzen- und Kaninchendarm bot Gravitol den gleichen doppelsinnigen Effekt[2]. Erschlaffungen herrschten vor, die der Adrenalinwirkung glichen.

Der Blutdruck der Katze und des Kaninchens wurde deutlich, aber schnell vorübergehend gesenkt[2]. Der Senkung ging manchmal ein kurzer Anstieg voraus. Am durchströmten Ohrgefäßpräparat des Kaninchens fand Kingisepp[3] durch Gravitol Erweiterung der Gefäße. Verengerung trat nur bei niedrigen Konzentrationen, aber nicht regelmäßig auf. Gelegentlich zeigten sich auch mehrphasische Effekte. Adrenalin wurde nach Durchströmung mit Gravitol in vorher wirksamen Dosen unwirksam. In der gleichen Mitteilung berichtete Kingisepp über Untersuchungen von Fleisch, der auch bei der künstlich durchbluteten Hinterextremität der Katze durch Gravitol eine starke Gefäßerweiterung erhielt. Nach Donatelli und Shen[4] werden die vom Karotissinus ausgehenden vasomotorischen Reflexe nach intravenöser Injektion von Gravitol herabgesetzt.

* Die Arbeit wurde am 1. 4. 47 abgeschlossen.

b) Herzmuskel: Die Herzwirkung des Gravitols wurde zuerst von JACKSON[5] beobachtet. Er fand, daß 2—3 mg Gravitol intravenös beim Hund die Schlagfolge der Herzkammer bis zum Block verlangsamte. Diese Wirkung wurde durch Atropin nicht beeinflußt. Barium wirkte antagonistisch, nicht aber Aconitin und Adrenalin. Außerdem wurde die Resistenz des Herzmuskels gegenüber Flimmern durch elektrische Reizung erhöht.

Die letzte Beobachtung wurde von MEIJBOOM[6] am Straubpräparat des Froschherzens bestätigt. VAN DONGEN[7] kam zu demselben Resultat an Katzen und Kaninchen. Er fand, daß die refraktäre Periode sowie die Reizleitungszeit nicht beeinflußt werden und führte die Wirkung auf eine Herabsetzung der Erregbarkeit zurück. Demgegenüber sah DE BOER[8] am in situ suspendierten Froschherzen eine Abnahme der Frequenz mit einer Verlängerung der refraktären Periode.

c) Skelettmuskulatur: Über Beobachtungen am Skelettmuskel liegen keine Berichte vor. Einige orientierende Versuche am isolierten Froschrectus ließen eine deutliche Hemmung der Acetylcholinkontraktur durch Gravitol erkennen.

Auf der Basis der Theorie der neuromuskulären Reizübertragung durch einen dem Acetylcholin ähnlichen Stoff war dieser Befund die Veranlassung dazu, bei einem an der hiesigen psychiatrischen Universitätsklinik stationären Fall von Myotonie eine Beeinflussung der tonischen Zustände durch Gravitol zu versuchen (BÜSSOW[9]). In der Tat war nach intravenöser Injektion von 2 cm³ der Gravitollösung „Bayer" (1,5%) eine leichtere Erschlaffung der Muskulatur sowohl subjektiv als auch objektiv (am Ergographen) zu verzeichnen.

II.

An Hand von Experimenten am isolierten Froschmuskel sollte versucht werden, die Bedingungen für das Zustandekommen der Gravitolwirkung auf den Skelettmuskel näher zu analysieren.

Methodik.

Als Versuchsobjekt diente der isolierte M. rectus abdominis des Frosches. Der Muskel wurde in 65 cm³ einer 0,69%igen Ringerlösung suspendiert und mit 3 g belastet. Die Registrierung erfolgte über einen isotonischen Schreibhebel auf einem langsam rotierenden Kymographion. Die Übertragung war 7fach. Die Temperatur der Badflüssigkeit betrug 13—15° C. Die Versuche fanden in den Monaten September bis November statt.

Es wurde nach einer Modifikation der Methode vorgegangen, die GADDUM[10] zur biologischen Bestimmung eines acetylcholinartigen Stoffes in Gewebsextrakten angab. Ebenso wie sich hierbei die Wirkung einer unbekannten Substanzmenge mit einer bekannten vergleichen läßt, kann man den Wirkungsverlust einer bekannten Acetylcholinkonzentration durch Vorbehandlung mit Gravitol quantitativ an der Verringerung der Kontrakturhöhe feststellen.

Voraussetzung für die Auswertbarkeit beider Methoden ist, daß eine gleiche Acetylcholinkonzentration am gleichen Muskel bei mehrmaliger Reizung jeweils die gleiche Hubhöhe erzielt. Nach GADDUM ist das der Fall, wenn die Kontraktur jeweils nach der gleichen Zeit durch Auswaschen mit Ringerlösung unterbrochen wird und die nächsten Acetylcholingaben ebenfalls in gleichen Zeitabständen erfolgen.

Diese Voraussetzung traf bei unseren Versuchen nicht in vollem Maße zu. Bei Beginn jedes Versuches zeigte sich fast regelmäßig ein mehr oder weniger starker Abfall der Empfindlichkeit des Präparates. Es wurde daher erst 3—4mal Acetylcholin (je 4 Min. lang) bis zur annähernden Konstanz der Hubhöhen einwirken lassen und die dann erzielte Höhe als Bezugsgröße gewählt. Nach Vorbehandlung mit Gravitol wurde Acetylcholin in derselben Konzentration und in denselben Zeitabständen gegeben wie vorher. Die Zeit der Ringerauswaschung richtete sich nach der Dauer der Gravitoleinwirkung, um zu erreichen, daß der zeitliche Abstand der Acetylcholinkontrakturen im Verlaufe eines Versuches immer konstant blieb. Eine anschaulichere Erläuterung bietet Abb. 1.

Die verwendeten Substanzen waren Acetylcholin „Roche" und Gravitollösung „Bayer". Die erforderliche Konzentration wurde durch Lösung in Ringerflüssigkeit hergestellt. Zur Anwendung wurden die Lösungen gegen das einfache Ringerbad ausgewechselt.

In mehreren Versuchsreihen wurde die Konzentration des Gravitols sowie die Dauer seiner Einwirkung in geometrischer Progression variiert. Kontrollversuche ohne Gravitol ergaben, daß keineswegs in allen Fällen die Hubhöhen so annähernd konstant blieben wie in Abb. 1. Vielmehr wurde — außer der schon erwähnten schnellen Empfindlichkeitsabnahme bei Versuchsbeginn — im weiteren Verlauf des Versuches eine allmähliche Abnahme oder auch Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber der gleichen Acetylcholinkonzentration beobachtet. Es kam auch vor, daß Präparate sprunghafte Änderungen der Reaktion zeigten. Solche wurden aber als ungeeignet für die Auswertung nicht mit herangezogen.

Daß sich trotz dieser Mängel bei einer genügenden Anzahl von Versuchen brauchbare Resultate erzielen lassen, zeigt die Aufstellung der Versuchsergebnisse (Tabelle 1) und ihre graphische Darstellung.

Tabelle 1. *Beispiel einer Versuchsreihe* (Auszug aus den Versuchsprotokollen).

Versuchs-Nr.	A.Ch.-Konzentration 10^{-6} mol/l	Erste Kontraktur relative Höhe	Kontraktur unmittelbar vor Gravitol: Zeit nach der ersten Kontraktur in Min.	Kontraktur unmittelbar vor Gravitol: relative Höhe	Gravitoleinwirkung: Konzentration 10^{-6} mol/l	Gravitoleinwirkung: Dauer in Min.	Höhe nach Gravitol	Stärkste beobachtete Kontraktur nach Auswaschung: Zeit nach Gravitol in Min.	Stärkste beobachtete Kontraktur nach Auswaschung: relative Höhe	Mittlere Hemmung in %	Abweichung
80	3,2	100	30	100	3,2	20	93	30	96		
78	10	104	30	100	3,2	20	93	60	111	(7)	(0)
79	3,2	115	30	100	10	20	61	120	105		+ 3
77	10	113	30	100	10	20	66	60	99	37	− 4
66	1	168	30	100	32	20	18	90	89		
85	10	108	30	100	32	20	22	90	97	77	± 5
108	10	111	30	100	32	20	28	90	100		
65	1	145	30	100	100	20	3	90	97		
86	10	97	30	100	100	20	9	90	93	94	± 3
107	10	108	30	100	100	20	5	90	97		

Die Hubhöhen wurden von dem durchschnittlichen Niveau der Fußpunkte aus gemessen, das sich, wie Abb. 1 zeigt, nicht wesentlich ändert. Sie wurden auf die letzte Kontraktur vor der Gravitoleinwirkung bezogen, wobei deren Höhe gleich 100 gesetzt wurde, um die prozentuale Hemmung unmittelbar ablesen zu können.

Geringe Hemmungswerte sind nicht eindeutig zu bewerten, da sie innerhalb der Fehlerbreite der Methode liegen. Sie wurden daher in Klammern gesetzt. Die Acetylcholinkonzentration wurde wegen der verschiedenen Empfindlichkeit der einzelnen Muskeln zwischen 10^{-5} und 10^{-6} mol/l so gewählt, daß ein gut meßbarer Ausschlag des Schreibhebels erfolgte. Wie sich herausstellte, haben diese Variationen auf die Größe der Hemmung keinen Einfluß.

Zusammengefaßt ergeben sich aus den Versuchsreihen folgende Resultate: 1. Vorbehandlung des Muskels mit Gravitolkonzentrationen unter 3×10^{-6} mol/l blieb ohne Wirkung auf die folgende Acetylcholinkontraktur. Durch Gravitolvorbehandlung in Konzentrationen von 3×10^{-6} bis 3×10^{-4} mol/l erleidet das Acetylcholin (mittlere Konzentration 5×10^{-6} mol/l) einen Wirkungsverlust, der von der jeweiligen Gravitolkonzentration in gesetzmäßiger Weise abhängig ist. Gravitol über 3×10^{-4} mol/l führt zu völliger Hemmung. Die Beziehung $\frac{\log \text{Konzentration}}{\text{Wirkung}}$ entspricht einer S-förmigen Kurve (Abb. 2). Die Acetylcholinkontraktur verliert nicht nur an Höhe, sondern sie steigt auch nach einer verlängerten Latenzzeit viel langsamer an, besonders nach hohen Gravitolgaben.

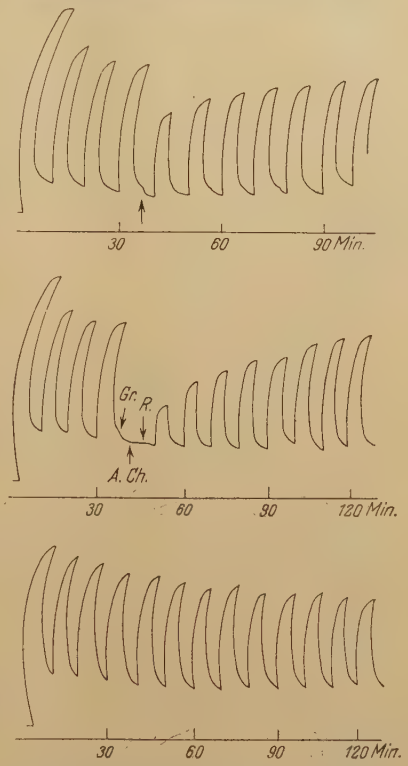


Abb. 1. Beispiele zu den im Text beschriebenen Versuchen. Auf 10^{-5} mol/l Acetylcholin erfolgt eine Kontraktur. Nach 4 Min. Auswaschung mit Ringerlösung, nach weiteren 6 Min. erneute Acetylcholingabe. Die beiden unteren Versuche wurden gleichzeitig an den beiden Recti desselben Frosches durchgeführt. Oben: Bei ↑ 2 Min. Vorbehandlung mit $3{,}2 \times 10^{-5}$ mol/l Gravitol. Partielle Hemmung der folgenden Acetylcholinkontraktur. Normale Reaktion nach 50 Min. Mitte: Bei $3{,}2 \times 10^{-4}$ mol/l Gravitol totale Hemmung nach 2 Min. Vorbehandlung. Normale Reaktion nach 70 Min. Unten: Kontrollversuch.

2. Zum Erreichen dieser Wirkung ist eine Vorbehandlungszeit von mindestens 2 Min. erforderlich. Längere Einwirkungszeiten erhöhen den Effekt nicht mehr wesentlich (Abb. 3).

3. Die Wirkung ist in allen angewandten Konzentrationen reversibel. Sie läßt sich durch mehrfaches Auswaschen im Verlaufe von $^1/_2$—1 Stunde wieder rückgängig machen, wobei das Wiedererlangen der normalen Reaktionsfähigkeit zuerst schnell, dann immer langsamer vor sich geht (Abb. 1). Ob noch ein Hemmungsrest bestehen bleibt, ist schwer zu beurteilen, da sich das Verhalten eines Muskels nicht

unbegrenzt verfolgen läßt. Außerdem zeigen die Kontrollversuche, wie schon erwähnt, ein wechselndes Verhalten bei längerer Versuchsdauer.

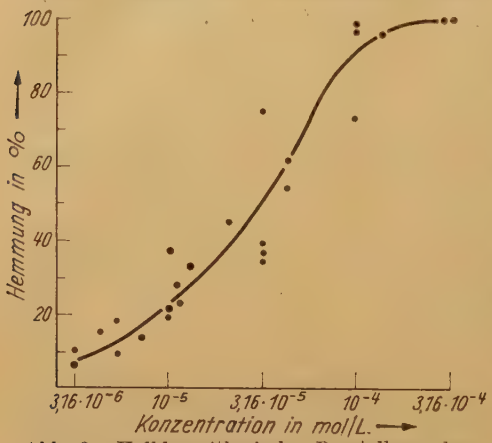


Abb. 2. Halblogarithmische Darstellung der Konzentrationswirkungsbeziehung bei 2 Min. Vorbehandlung.

Weitere Versuche mit Gravitol: Läßt man Acetylcholin in Gegenwart von Gravitol auf den Rectus einwirken, so ist die Hemmung noch bedeutend stärker als bei der einfachen Vorbehandlung. Die maximale Wirkung tritt dabei etwa nach 15 Min. ein. Die stärkere Hemmung erklärt sich daraus, daß ein Teil des Gravitols durch die Acetylcholinlösung wieder ausgewaschen wird, wenn diese kein Gravitol enthält. Die Konzentrationswirkungskurve in Abb. 2 würde sich also bei gleichzeitiger Einwirkung von Gravitol und Acetylcholin in der Richtung der niedrigeren Konzentrationen verschieben.

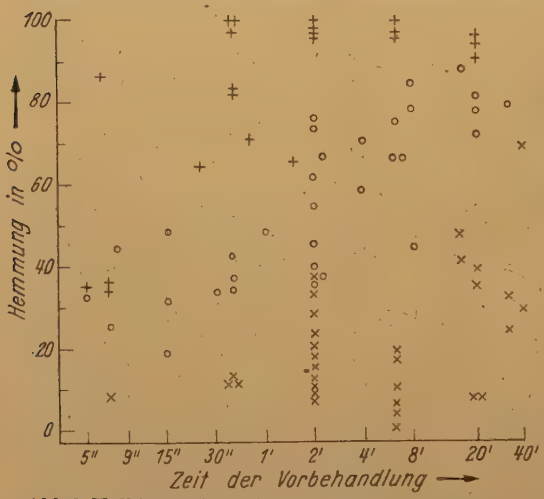


Abb. 3. Halblogarithmische Darstellung der Abhängigkeit der Hemmung von der Dauer der Vorbehandlung unter Berücksichtigung aller Versuche unterteilt in drei Konzentrationsbereiche: × = 3—11 × 10⁻⁶ mol/l, o = 2—7 × 10⁻⁵, + = 1—4,2 × 10⁻⁴ mol/l.

Gibt man Gravitol auf der Höhe der Acetylcholinkontraktur, so kommt es zur Erschlaffung, deren Grad von der Gravitolkonzentration abhängt.

Die Acetylcholinkonzentration, die am unbehandelten Muskel eine maximale Kontraktur hervorruft (größenordnungsmäßig 10^{-2} mol/l), wirkte am Muskel, der gleichzeitig unter Gravitoleinwirkung stand, mit der entsprechenden Hemmung ebenfalls maximal. Es gelang nicht, durch weitere Steigerung der Acetylcholinkonzentration die Hemmung zu überwinden. 10^{-1} mol/l Acetylcholin war für den Muskel mit Gravitol genau so toxisch wie ohne

dieses, was sich in einer völligen Unerregbarkeit, auch nach dem Auswaschen, äußerte.

Beeinflussung anderer Kontrakturen. Die Wirkung von Carbaminoylcholin (Doryl) auf den Rectus wurde durch Gravitol in ähnlicher Weise herabgesetzt wie die des Acetylcholins (Abb. 4). Ebenso war eine deutliche Hemmung der durch Kaliumchlorid hervorgerufenen Kontraktur nachzuweisen (Abb. 5). Die Kontraktur durch Koffein trat trotz Anwesenheit von 5×10^{-4} mol/l Gravitol ungehemmt ein. Bei Einwirkung von Aqua destillata auf den Muskel kommt es zu der

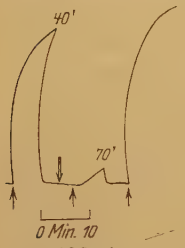


Abb. 4.

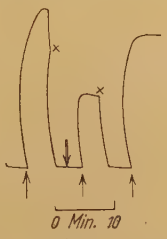


Abb. 5.

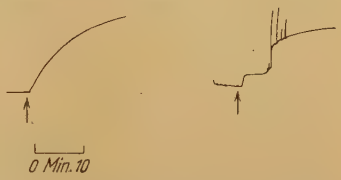


Abb. 6.

Abb. 4. Bei ↑ 3×10^{-5} mol/l Doryl. Bei ↓ 2 Min. 3×10^{-4} mol/l Gravitol. Mehrfache Ringerauswaschung bei stehender Trommel in den angegebenen Zeiten.

Abb. 5. Bei ↑ 0,2% KCl (Gesamtlösung isotonisch). Bei ↓ 3×10^{-4} mol/l Gravitol 2 Min. Bei × 40 Min. Trommelstillstand und mehrfache Ringerauswaschung.

Abb. 6. Beide Recti eines Frosches. Der eine (in der Abbildung links) war 15 Min. mit 3×10^{-4} mol/l Gravitol vorbehandelt. Bei ↑ Aqua destillata.

sog. Wasserstarre. Auch diese wurde durch Gravitol (5×10^{-4} mol/l) nicht beeinflußt. Wohl aber unterblieben die sonst regelmäßig beim Eintreten der Starre zu beobachtenden Spontanzuckungen (Abb. 6).

III.

Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß das Gravitol eine bestimmte charakteristische Wirkung am Skelettmuskel ausübt. Es setzt die Wirkung von Acetylcholin in einem von seiner Konzentration abhängigen Grade herab. Für das Zustandekommen dieses Antagonismus kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

1. Direkte Reaktion zwischen den beiden Substanzen, etwa im Sinne der Bildung eines unwirksamen Komplexes, sei es bereits in vitro (Pseudoantagonismus) oder an der Zelle selbst.

2. Aktivierung der Cholinesterase.

3. Erschwerung des Zutrittes des Erregungsstoffes zum Ort seiner Wirkung.

4. Direkter Angriffspunkt des Gravitols ist die kontraktile Substanz des Muskels.

Zu 1. Dieser Mechanismus konnte ausgeschlossen werden durch das Fehlen einer gesetzmäßigen Beziehung zwischen den molaren

Konzentrationen von Acetylcholin und Gravitol, in dem Sinne, daß gleiche Konzentrationsverhältnisse die gleiche Wirkung ergeben würden.

Zu 2. Eine Aktivierung der Cholinesterase, wie sie z. B. für Glutathion und Sympatol von Keeser[11] beschrieben wurde, kommt ebensowenig in Betracht, da der fermentstabile Carbaminsäureester des Cholins ebenfalls in seiner Wirkung gehemmt wurde. Überhaupt kann eine spezifische Wirkung auf das Acetylcholin wohl verneint werden. Nach neueren Untersuchungen von Scheinfinkel[12] ist der Kaliumeffekt ein grundsätzlich anderer als der des Acetylcholins. Eine Hemmung ist jedoch bei beiden vorhanden.

Zu 3. Der Beurteilung dieses Punktes steht die Tatsache hindernd im Wege, daß über den Angriffspunkt des Acetylcholins bzw. der Erregungsstoffe überhaupt noch keine absolute Klarheit herrscht. Hier stehen im wesentlichen 2 Auffassungen gegenüber: einmal die Auffassung als Potentialgift, wie sie von der Straubschen Schule vertreten wird und von Gremels[13] zusammenfassend dargestellt wurde. In diesen Mechanismus könnte das Gravitol in der Weise eingreifen, daß es die Zellmembran im Sinne einer Herabsetzung der Permeabilität verändert. Es würde somit in die Reihe der „Zustandsstoffe" nach Gremels gehören, die die Potentialwirkungsbedingungen durch eine Zustandsänderung der Zellmembran verändern.

Die andere Auffassung geht dahin, daß das Acetylcholin durch Angriff an spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche wirksam wird. Sie wurde zuerst von Clark[14] vertreten, später von Jung[15] (s. hierzu auch [23–27]) experimentell weiter gestützt. Clark nahm für den Antagonismus Acetylcholin-Atropin eine Verdrängungsreaktion an den spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche an, für die er nachwies, daß sie dem Massenwirkungsgesetz folgt. Würde eine solche beim Gravitol vorliegen, so müßte man erwarten, daß die Hemmung durch eine entsprechende Erhöhung der Acetylcholinkonzentration beseitigt werden kann. Daß dieses beim Gravitol nicht möglich ist, wurde oben gezeigt.

Zu 4. Daß die kontraktile Substanz selbst der Angriffspunkt des Gravitols ist, gewinnt an Wahrscheinlichkeit, wenn man die Befunde der anfangs zitierten Autoren an anderen Organsystemen mit heranzieht. Als statische Wirkung macht sich überall eine Herabsetzung der Erregbarkeit sowohl gegenüber physiologischer wie auch experimenteller Reizung bemerkbar. Bei Organen, die unter einem vegetativen Dauertonus stehen, bewirkt Gravitol Erschlaffung unabhängig von der Wirkungsrichtung der sympathischen bzw. parasympathischen Innervation (dynamische Wirkung). Durch Gifte, die die vegetative Reizübertragung hemmen (Atropin, Ergotamin), wird dieser Effekt

nicht beeinflußt. Andererseits werden fördernde vegetative Einflüsse gehemmt oder sogar in ihrer Wirkungsrichtung umgekehrt (Käer und Barkan[2], Kingisepp[3], Okazaki[20]).

Dem zu widersprechen scheint die dem Gravitol eigene orasthinähnliche Wirkung auf die glatte Muskulatur, die Veranlassung zu seiner therapeutischen Anwendung als wirksames Uterustonikum war. Diese Wirkung wurde im Experiment jedoch nur in niedrigen Konzentrationen beobachtet. In stärkeren Konzentrationen traten nur die hemmenden Effekte auf, während mittlere Konzentrationen sehr wechselnd in ihrer Wirkungsrichtung waren. Die mehrphasischen Effekte am Gefäßsystem könnten auf einem langsamen Anstieg der Gravitolkonzentration am Ort der Wirkung beruhen. Eine Erregung des Froschrectus wurde bei unseren Versuchen niemals beobachtet.

Käer und Barkan[2] unterscheiden zweierlei spezifische Grundwirkungen des Gravitols. Die Beobachtung, daß die orasthinartige Wirkung beim Ganztier ebenso wie die zentral-toxischen Erscheinungen des Vergiftungsbildes mit größerer Sicherheit auftraten, veranlaßte sie, die Möglichkeit einer zentralen erregenden und einer entgegengesetzt gerichteten peripheren Wirkung in Betracht zu ziehen. Vielleicht ließe sich auch die Möglichkeit einer erregenden Wirkung auf die peripheren vegetativ-nervösen Elemente diskutieren, die bei höheren Konzentrationen wegen der direkten lähmenden Muskelwirkung nicht mehr zur Geltung kommen kann.

Über den Modus der Gravitolwirkung am isolierten Froschrectus lassen sich demnach aus unseren Befunden keine endgültigen Schlüsse ziehen. Es konnte lediglich ein Pseudoantagonismus und eine Wirkung über die Cholinesterase ausgeschlossen werden. Die Gestalt der Konzentrationswirkungskurve (Abb. 2) könnte man mit Clark[14] als Ausdruck einer reversiblen Bindung an das biologische Substrat ansehen, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt. Nach Axmacher[16] läßt sie jedoch auch andere Deutungen zu. Auch die Zeit-Wirkungsbeziehung (Abb. 3) ist als charakteristisch nur für das benutzte Versuchsobjekt bei der angegebenen Versuchsanordnung zu betrachten. Zum Erreichen des einer bestimmten Konzentration zukommenden Wirkungsgrades ist eine Mindestzeit der Einwirkung erforderlich, die im wesentlichen die Diffusionszeit in das Gewebe einschließen dürfte. Clark betont die Fragwürdigkeit einer bestimmten Deutung dieser Beziehung.

Allgemein läßt sich lediglich folgendes feststellen: Die Wirkung des Gravitols am isolierten Froschrectus besteht in einer reversiblen Zustandsänderung, die die kontraktile Substanz unfähig macht, in der gewohnten Weise auf Erregungsreize zu antworten. Schädigungsreize werden nicht beeinflußt.

In nähere Erwägung wäre dabei zu ziehen, ob die Oberflächenaktivität des Gravitols bei diesem Vorgang eine Rolle spielt, analog den Untersuchungen von

v. Issekutz[17]. Die Oberflächenspannung der Ringerlösung wird durch 10^{-4} mol/l Gravitol (der Lösung von Bayer) um 23%, durch 10^{-5} mol/l um 12% herabgesetzt*.

Daß die oben erwähnten doppelsinnigen Effekte auch bei anderen Substanzen dieser Art vorkommen, zeigt das Beispiel des Octins, eines synthetischen Spasmolytikums, das ebenso wie Gravitol in schwachen Konzentrationen erregend auf die glatte Muskulatur wirkt (Miyake[18]).

In diesem Zusammenhang interessieren eine Reihe von Arbeiten japanischer Autoren über die Beziehung zwischen pharmakologischer Wirkung und chemischer Konstitution (Anan[19], Okazaki[20], Fujimoto[21]). Eine große Zahl von Verbindungen des gleichen Konstitutionstyps wie Gravitol, nämlich Phenoxyalkylamine, wurden untersucht, wobei die Grundwirkungen des Gravitols immer wieder erschienen, jedoch durch bestimmte Veränderungen der Substituenten in charakteristischer Weise modifiziert wurden. So trat z. B. die erregende Wirkung besonders stark hervor beim Tastromin, einem dem Gravitol entsprechenden Diallylaminoäthyläther (Anan[19]).

Fourneau synthetisierte eine größere Anzahl von Phenoläthern, deren pharmakologische Eigenschaften im Pariser Institut Pasteur untersucht wurden. Der Hauptvertreter dieser Verbindungen, das 1262 F, bietet hinsichtlich seiner pharmakologischen Wirksamkeit zahlreiche Parallelen zum Gravitol (Bovet, Fourneau u. a.[22]).

In diesem Rahmen gesehen gehört das Gravitol zu einer großen Gruppe von Verbindungen, die den allgemeinen Charakter von Phenylaminoalkyläthern aufweisen und durch bemerkenswerte vegetativ wirksame Eigenschaften gekennzeichnet sind.

Zusammenfassung.

Am isolierten M. rectus abdominis des Frosches bewirkt Gravitol eine Hemmung der Kontraktur, die durch Acetylcholin hervorgerufen wird. Ein spezifischer Antagonismus konnte ausgeschlossen werden, da auch andere Erregungsreize, wie Doryl und Kaliumchlorid, in ihrer Wirkung gehemmt werden. Kontrakturen, die auf irreversiblen Schädigungen (Koffein, hypotonische Lösungen) beruhen, werden nicht beeinflußt. Somit liegt wahrscheinlich eine direkte Wirkung auf die Muskelzelle vor, deren Erregbarkeit herabgesetzt wird. Die Möglichkeiten einer genaueren Festlegung des Angriffspunktes werden diskutiert.

Literatur.

[1] Eichholtz, Fr.: Münch. med. Wschr. **75**, 1281 (1928). — [2] Käer, E. u. G. Barkan: Arch. exper. Path. (D.) **170**, 111 (1932). — [3] Kingisepp, G.: Arch. exper. Path. (D.) **177**, 587 (1934). — [4] Donatelli, L. et I. Shen: Arch. internat. Pharmacodynam. **60**, 331 (1938). — [5] Jackson, E.: J. Pharmacol. (Am.) **39**, 254 (1930). — [6] Meijboom, J.: Arch. exper. Path. (D.) **163**, 583 (1931). — [7] van Dongen, K.: Arch. internat. Pharmacodynam. **53**, 80; **55**, 267 (1936). — [8] de

* Gemessen nach der Adhäsionsringmethode mit der Torsionswaage von Hartmann und Braun.

Boer, S.: Arch. internat. Pharmacodynam. **54**, 65 (1936). — [9] Büssow, H.: Unveröffentlichte Beobachtungen aus der Hamburger psychiatrischen Universitätsklinik. — [10] Chang, H. L. and J. H. Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **79**, 255 (1933). — [11] Keeser, E.: Klin. Wschr. **1938**, 1811. — [12] Scheinfinkel, N.: Helvet. phys. Acta **2**, 50 (1944). — [13] Gremels, H.: Erg. Physiol. **42**, 53 (1939). — [14] Clark, A. J.: General Pharmacology. In Handbuch der experimentellen Pharmakologie, 4. Erg.-Bd. 1937. — [15] Jung, F.: Arch. exper. Path. (D.) **196**, 302 (1940). — [16] Axmacher, Fr.: Allgemeine Pharmakologie. (Springer 1938). — [17] Issekutz, B. v. u. a.: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 8 (1934). — [18] Miyake, S.: Ref. Ber. Physiol. **104**, 670 (Original japanisch). — [19] Anan, S.: Ref. Ber. Physiol. **53**, 430; **63**, 397 (Original japanisch). — [20] Okazaki, T.: Ref. Ber. Physiol. **67**, 590; **68**, 592; **69**, 797. — [21] Fujimoto, Y.: Fol. pharmacol. jap. **17**, Opera originalia 1 (1933), 15 u. 33 (1934). — [22] Bovet, D., Fourneau, E. u. a.: Arch. internat. Pharmacodynam. **62**, 234 (1939). — [23] Jung, Fr.: Arch. exper. Path. **197**, 67 (1940). — [24] Jung, Fr.: Klin. Wschr. **1942**, 1030. — [25] Moratschek, J.: Arch. exper. Path. **203**, 278 (1944). — [26] Voigt, M.: Arch. exper. Path. **203**, 282 (1944). — [27] Asen, H.: Arch. exper. Path. **204**, 67 (1944).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über den Nachweis von Strukturveränderungen der Serumproteine mit Hypochlorit.

Von

H. Herken und J. Schunk.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juni 1948.)

Der komplizierte Bau der Proteinmoleküle ermöglicht eine außerordentlich vielfältige Reaktionsfähigkeit, die weniger von den Peptidhauptketten, sondern in viel stärkerem Maße von den verschiedenen chemischen Gruppen in den Seitenketten beeinflußt wird. Die Seitenketten, die durch die Reste der einzelnen Aminosäuren gebildet werden, bestimmen sowohl den amphoteren Charakter der Proteine, als auch ihre fett- und wasserlöslichen Eigenschaften. Auch für die räumliche Anordnung der Peptidketten im Molekül sind sie von Bedeutung, weil sie ohne Zweifel eine ausschlaggebende Rolle bei der Faltung der Polypeptidketten spielen. Da die Seitenketten verschiedene Länge besitzen, ist eine einfache parallele Ausrichtung der Hauptketten in Bündeln sehr unwahrscheinlich.

Hiergegen sprechen auch folgende Beobachtungen. Strukturanalysen mit Röntgenstrahlen an einem Linearprotein, dem β-Keratin, haben einen Abstand von 3,32 ÅE zwischen zwei analogen Gruppen, also zwei Carbonyl- oder zwei Iminogruppen der Peptidhauptkette ergeben[1]. Beim Seidenfibroin wurde 3,5 ÅE Abstand zwischen gleichen Gruppen gefunden[2]. Albumin- und Globulinmoleküle sind Sphäroproteine, deren Dimensionen noch nicht so genau festliegen. Als äquatoriale Durchmesser werden etwa 36 ÅE angegeben, während die Länge entsprechend der verschiedenen Molekülgröße erheblich differiert. Für Serumalbumin mit einem Molekulargewicht von etwa 70000 beträgt der Wert annähernd 150 ÅE, für Fibrinogen dagegen bei einem Molekulargewicht von 500000 etwa 900 ÅE[3]. Im Serumalbumin liegen ungefähr 582 Peptidbindungen je Mol vor[4].

Unter Berücksichtigung dieser Größen muß man daher annehmen, daß die Peptidketten in diesen Proteinen in einem stark gefalteten bzw. geknäuelten Zustand vorliegen. Über das wichtige Problem der eigentlichen Anordnung der Ketten im Molekül ist bisher wenig Sicheres bekannt. Für die Fixierung der Lage werden Valenzbindungen zwischen

[1] Astbury, W. T. u. Bell: Nature (Brit.) **147**, 696 (1941). — [2] Zit. nach H. B. Bull: Protein Structure Advances in Enzymology, Bd. I, S. 1. 1941. [3] Cohen, E. J., J. L. Queley, L. E. Strong, W. L. Hughes jr. und S. H. Armstrong J. clin. Invest. (Am.) **23**, 417 (1944). — [4] Brand, E., B. Kassel u. L. J. Saidel: J. clin. Invest. (Am.) **23**, 437 (1944).

sauren und basischen Gruppen der Seitenketten, Esterbildung zwischen Hydroxyl und Carboxylgruppen oder auch Brückenbindungen zwischen den Thiolgruppen des Cysteins von Bedeutung sein. Dazu kommen noch die bei so großen und kompliziert gebauten Naturstoffen mannigfaltigen zwischenmolekularen Bindungen.

Die Existenz zwischenmolekularer Bindungen ließ sich an synthetisch hergestellten hochmolekularen eiweißähnlichen Substanzen auf röntgenologischem Wege recht exakt beweisen [5]. Von PAULING und NIEMANN [6] ist auf die Bedeutung intermolekularer Wasserstoffbindungen in der Eiweißchemie hingewiesen worden in dem Sinne, daß die spezifische Konfiguration der Eiweißmoleküle zum Teil durch Bindungen stabilisiert wird, die nur schwach sind und daher schon durch geringfügige Eingriffe verändert werden können.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die Eiweißkörper unter bestimmten Bedingungen in definierte Bruchstücke zerfallen können. So wurde z. B. von G. SCHRAMM [7] am Tabakmosaikvirus und von I. B. ERIKSON und TH. SVEDBERG [8] am Hämocyanin von Helix pomatia beobachtet, daß diese Eiweißkörper nur in einem bestimmten p_H-Bereich stabil sind, darüber hinaus aber reversibel gespalten werden. Anscheinend können auch Neutralsalze ähnliche Veränderungen herbeiführen. Bei einem mit Ammoniumsulfat gefällten Albumin wurden mit der Ultrazentrifuge ein Hauptmolekül mit bestimmter Sedimentationskonstante, daneben aber noch größere und kleinere Moleküle festgestellt, die als Dissoziations- oder Assoziationsprodukte aufgefaßt wurden [9]. Durch die Aussalzung werden an den Proteinen gewisse Denaturierungserscheinungen ausgelöst, über die ebenfalls interessante Beobachtungen vorliegen. So fanden H. B. BULL und NEURATH [10] als Folge der Denaturierung von Eiweißkörpern durch Erwärmung oder Aussalzung Anhaltspunkte, die auf eine Lösung intermolekularer Kohäsionsbindungen hindeuten, wobei die Polypeptidketten die Möglichkeit haben, sich zu strecken oder zu entrollen. Unter Berücksichtigung dieser Befunde, daß Neutralsalze bestimmte von dem Bau der Eiweißkörper abhängige Veränderungen hervorrufen können, haben wir in früheren Arbeiten [11] vergleichende Untersuchungen an Serumproteinen von normalen und hungerödemkranken Patienten mit Hilfe der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, wobei die jeweils auftretende Trübungsintensität mit einem Photozellenkolorimeter registriert wurde. Hierbei ergaben sich auffällige Unterschiede. Im Gegensatz zu dem von der Höhe der Serumeiweißwerte unabhängigen, gleichmäßigen Kurvenverlauf von Normalseren zeigten wiederholte Untersuchungen an Hungerödemkranken nicht nur zusätzliche Fällungsmaxima, sondern auch erhebliche Abweichungen der Kurven untereinander [12].

Verschiedene Beobachtungen sprachen für die Annahme, daß die wesentliche Schädigung in einer Veränderung der Vorgänge bei der Proteinsynthese besteht. Ausgehend von den Erfahrungen über die Wirkungsweise proteolytischer Fermente gegenüber bestimmten synthetischen Substraten [13], die eine hohe Spezifität der

[5] BRILL, R.: Naturw. **29**, 220 (1941). — [6] PAULING u. NIEMANN: J. amer. chem. Soc. **61**, 1860 (1939). — [7] SCHRAMM, G.: Naturw. **31**, 94 (1943). — Z. Naturforsch. **2b**, 112 (1947). — [8] ERIKSON, J. B. u. TH. SVEDBERG: Biol. Bull. (Am.) **71**, 498 (1936). — [9] MUTZENNBECHER, P. v.: Biochem. Z. **266**, 226 (1933). — [10] BULL, H. B. u. NEURATH: J. biol. chem. **115**, 519 (1936); **118**, 163 (1937). — [11] HERKEN, H. u. H. REMMER: Dtsch. Gesdh.wes. **1946**, 683. — [12] HERKEN, H. u. H. REMMER: Klin. Wschr. **1947**, 469. — [13] HERKEN, H., R. MERTEN u. A. SCHMITZ: Naturw. **30**, 225 (1942). — Z. physiol. Chem. **275**, 29 (1942).

Ferment-Substratbindung ergeben haben, wurde von uns die Einwirkung der Eigenfermente des Serums auf die in der Blutflüssigkeit enthaltenen Proteine bei normalen und Ödemkranken untersucht. Hierbei gingen wir von der Überlegung aus, daß das Fehlen oder der Mangel an bestimmten biologisch wichtigen Aminosäuren in den Eiweißkörpern für das Verhalten gegenüber den im Serum vorhandenen proteolytischen Fermenten nicht gleichgültig ist. Die nach 24stündiger „Autolyse" des Serums bei 37° C durchgeführten Messungen zeigten nun bei chronischen Ödemkranken eine deutliche Abnahme der Trübungsintensität gegenüber den Ausgangswerten vor allem im Bereich des Albumins, wie sich aus den mittleren Differenzen zwischen der Stärke der Trübung vor und nach 24stündigem Aufenthalt bei 37° C von Normalseren und Seren chronisch Ödemkranker ergab[12].

Weitere Versuche deuteten darauf hin, daß die bei Ödemkranken neu gebildeten Eiweißkörper offensichtlich nicht gleich waren, je nachdem pflanzliches oder tierisches Eiweiß als Nahrung verwendet wurde[14].

Alle diese Befunde sprechen bereits für das Vorliegen abnormer Strukturen der Proteine beim Hungerödem. Hierbei steht allerdings noch nicht fest, worauf die gefundenen Abweichungen bei diesen so kompliziert gebauten Molekülen beruhen.

Wir haben daher versucht, durch Abbau der Serumproteine mit Natriumhypochlorit weiteren Einblick in die festgestellten Unterschiede zu bekommen, nachdem sich herausgestellt hat, daß die Spaltungsgeschwindigkeit der Peptidbindung nach Einwirkung dieser Substanz von der *Struktur* der Substrate abhängig ist[15]. Bei Untersuchungen mit synthetischen Substraten ergaben sich überdies einige interessante Parallelen zu den mit proteolytischen Fermenten gewonnenen Ergebnissen. Für die Auslösung der Spaltungsreaktion sind in erster Linie *freie* Aminogruppen notwendig, die, wie analytisch-chemische Untersuchungen von Brand, Kassel und Saidel[4] gezeigt haben, in den einzelnen Proteinanteilen des Serums in wechselnder Menge vorkommen. Der Abbau von Albumin und Globulin mit Natriumhypochlorit lieferte neben CO_2 verschiedene Mengen an gasförmigem Stickstoff, der nicht nur bei der Spaltung von Peptidbindungen und bei der Zerstörung des Tryptophans frei wird, sondern wahrscheinlich zu einem großen Teil aus der Reaktion mit den polaren Gruppen des Arginins und aus der Lösung von Säureamidbindungen stammte[15]. Man konnte daher erwarten, daß die manometrische Bestimmung von CO_2 und gasförmigem Stickstoff Unterschiede zwischen den Proteinen normaler und Ödemkranker ergeben würde, wenn sich die einzelnen Abbauvorgänge nicht überlagern und damit eine Differenzierung unmöglich machen. Wir haben bereits in einer früheren Arbeit[15] auf die geringe Abnahme des Gesamtstickstoffs der Serumproteine bei Patienten mit chronischem Hungerödem, die durch den Verlust an gasförmigem Stickstoff nach Einwirkung von Natriumhypochlorit bedingt war, aufmerksam

[14] Herken, H. u. H. Remmer: Klin. Wschr. **1947**, 211. — [15] Herken, H. u. J. Schunk: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **1948**.

gemacht. Diese Befunde wurden an weiteren Fällen, die wir zum Teil wiederholt untersuchten, nachgeprüft und bestätigt. Bemerkenswert ist die Zunahme des N_2-Verlustes bei den Patienten T. und Hü., die in der Zwischenzeit zusätzlich tierisches Eiweiß erhielten. Die folgende Tabelle 1 enthält solche Versuche, denen entsprechende an normalem Serum gegenübergestellt sind.

Tabelle 1.

Serum	Gesamt-N in mg/0,1 cm³			N-Verlust in mg nach 30 Min.	Rest-N in mg je 0,1 cm³ zu Beginn	Abbau N in mg/0,1 cm³	
	zu Beginn	nach 30 Min. Einwirkung von NaOCl	nach 24 Std. Einwirkung von NaOCl			nach 30 Min. Einwirkung von NaOCl	nach 24 Std. Einwirkung von NaOCl
a) Normale Seren.							
1. S. 12. 2. 48	1,12	0,98	0,98	0,14	0,03	0,39	0,77
2. S. 19. 4. 48	0,97	0,87	0,87	0,10	0,03	0,36	0,42
3. H. 2. 4. 48	1,26	1,12	1,12	0,14	0,03	0,37	0,53
4. H. 10. 5. 48	1,193	1,075	1,085	0,118	0,028	0,33	0,41
5. H. 11. 5. 48	1,12	1,059	1,059	0,061	0,031	0,266	0,36
6. N. 20. 5. 48	1,176		0,966	0,21 *	0,034	0,25	0,334
7. V. 27. 5. 48	1,134	0,994	1,022	0,14	0,036	0,41	0,478
8. W. 1. 6. 48	1,134	1,04		0,094	0,031	0,415	
9. R. 1. 6. 48	1,194	0,924	0,938	0,270	0,028	0,408	0,429
b) Hungerödeme.							
1. T. 16. 3. 48	1,12	1,12	1,12	0	0,05	0,37	0,47
2. T. 24. 3. 48	1,12	1,12	1,12	0	0,048	0,36	0,43
3. T. 21. 4. 48	1,085	1,02	—	0,065	0,045	0,32	0,41
4. K. 26. 4. 48	1,134	1,13	1,14	0,004	0,028	0,29	0,43
5. K. 3. 5. 48	1,184	1,18	1,18	0,004	0,03	0,26	0,42
6. Kl. 10. 5. 48	1,177	1,17	1,18	0,007	0,024	0,27	0,37
7. Kl. 20. 5. 48	1,216	1,225	1,225		0,029	0,28	0,34
8. Hü. 16. 3. 48	1,12	1,12	1,12	0	0,025	0,347	0,424
9. Hü. 24. 3. 48	1,21	1,19	1,19	0,02	0,04	0,32	0,45
10. Hü. 21. 4. 48	1,12	1,05	—	0,07	0,04	0,36	0,41

Ansätze zu a und b 2 cm³ Serum, 7 cm³ NaCl 0,9%. 2 cm³ NaOCl-Lösung (30 mg NaOCl/cm³) vor dem Versuch mit m-Essigsäure auf p_H 7,7 eingestellt. Temperatur 38° C. N-Bestimmungen: Mikrokjeldahl. Titration mit n/100 NaOH.

Die zu Beginn der Versuche vorgenommene Rest-N-Bestimmung wurde in der üblichen Weise mit 2 cm³ Serum durchgeführt. Der Gesamtstickstoff wurde jeweils an 0,1 cm³ Serum ermittelt. Bei dieser kleinen Menge kann unter den gewählten Bedingungen die Reaktion des Hypochlorits mit dem eigentlichen „Rest-N" — Harnstoff, Kreatin

* Nach 24 Stunden.

und Kreatinin reagieren ebenfalls unter N_2-Entwicklung — vernachlässigt werden, unter der Voraussetzung daß die zu Beginn der Versuche festgestellten Reststickstoffmengen innerhalb der Norm liegen. Andernfalls ist vorher eine Dialyse notwendig. Um Mißverständnisse zu vermeiden, bezeichnen wir den nach Spaltung der Proteine und nach Fällung der hochmolekularen Eiweißkörper mit Trichloressigsäure in Lösung verbleibenden Stickstoff als „Abbau-N".

Auf die Bedeutung basischer Aminosäuren insbesondere des Lysins für das Zustandekommen der beim Hungerödem gefundenen Abweichungen haben wir bereits früher hingewiesen[16]. Nach Angaben von Florkin und Duchateau[17] wird das molare Verhältnis zwischen Arginin und Lysin im allgemeinen sehr konstant gehalten. Nur beim Eiweißmangelödem sollen sich erhebliche Schwankungen finden. Der geringe Stickstoffverlust bei Patienten mit chronischem Hungerödem deutet darauf hin, daß die Serumproteine bei dieser Erkrankung unter den gegebenen Versuchsbedingungen weniger basische Gruppen aufweisen, die mit Hypochlorit unter Entwicklung von N_2 reagieren können als normale. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, daß die ε-Aminogruppe im Lysin und die Guanidinogruppe im Arginin normalerweise wahrscheinlich frei sind[18]. Es ist aber nicht sicher, ob dies auch unter pathologischen Bedingungen der Fall ist. Man kann daher aus den Ergebnissen nicht ohne weiteres den Schluß ziehen, daß die Proteine beim Hungerödem weniger Arginin enthalten. Bei der Reaktionsfähigkeit der polaren Gruppen der Seitenketten mit anderen organischen Verbindungen ist es durchaus möglich, daß die basischen Gruppen hierdurch dem Angriff des Hypochlorits entzogen werden. Hierüber werden vergleichende Untersuchungen am Gesamtprotein und Hydrolysaten Aufschluß geben können. Auch das normale Serumalbumin ist kein homogenes Protein. Hewitt[19] und Keckwick[20] konnten durch Salzfällung 3 gut definierte Fraktionen isolieren. Davon enthielt eine bis zu 8% Kohlenhydrat, während eine gut kristallisierende Fraktion völlig frei davon war.

Aus den in der Tabelle 1 angeführten Untersuchungen ist nicht ersichtlich, welcher Proteinanteil im Serum Ödemkranker von der Veränderung besonders betroffen ist. Wir haben daher ähnliche Versuche nach Aufteilung der Serumproteine in Albumin und Globulin

[16] Herken, H. u. H. Remmer: Ärztl. Wschr. **1946**, 283. — Klin. Wschr. **1947**, 211. — [17] Florkin et Duchateau: Act. biol. Belg. **1947**, 2. Zit. nach H. v. Kress u. H. Langecker: Ärztl. Wschr. **1946**, 5. — [18] Linderström-Lang, K.: Erg. Physiol. **35**, 434 (1933). — [19] Hewitt: Biochem. J. (Brit.) **30**, 2229 (1936); **31**, 360, 1047, 1534 (1937); **32**, 26 (1938). — [20] Keckwick: Biochem. J. (Brit.) **32**, 552 (1938).

durch Fällung mit 24 g Na_2SO_4 in 100 H_2O und anschließender Dialyse im WARBURG-Apparat unter gleichen Bedingungen vorgenommen, unter denen früher der Abbau der Peptide verfolgt wurde. Bei diesen Versuchen mußten allerdings die Veränderungen, die durch die Einwirkung von Neutralsalzen auf hochmolekulare Eiweißkörper entstehen, mit in Kauf genommen werden. Sie fallen aber bei diesen Untersuchungen nicht ins Gewicht, da jeweils Vergleiche mit Normalseren vorgenommen wurden.

Wir haben zunächst die Wirkung verschiedener Dosen Hypochlorit auf Albumin und Globulin normaler Seren durch Messung der beim Abbau der Proteine entstehenden Kohlensäure verfolgt. In kegelförmige WARBURG-Gefäße mit einem seitlichen Anhang wurden folgende Ansätze einpipettiert: 1,5 cm³ m/10 Phosphatpuffer p_H 6,3, 0,5 cm³ des Substrates (Serumalbumin bzw. Globulin jeweils 100 bzw. 200 γ N), 0,5 cm³ Natriumhypochloritlösung mit 3,7, 7,4 und 12,7 mg NaOCl, die mit m-Essigsäure vor dem Versuch auf p_H 7,7 eingestellt wurde. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration geschah mit der Glaselektrode. Nach Temperatur- und Druckausgleich wurde die Hypochloritlösung in den Hauptraum der Gefäße eingekippt. Versuchstemperatur in allen Fällen 38° C.

Tabelle 2.

Serumalbumin Menge in 8 Protein N	Serumglobulin Menge in 8 Protein N	NaOCl in mg	Versuchsdauer in Min.	CO_2 in mm³	N_2 in mm³
100	—	3,7	90	50,3	15
	100	3,7	90	39,8	6
100		12,7	90	57,6	10
—	100	12,7	90	19,1	2
200	—	7,4	90	92,6	27
—	200	7,4	90	82,8	22

Über das Verhältnis der Dosis zur entwickelten Menge CO_2 ist zu sagen, daß bei der Einwirkung von 3,7 bzw. 12,7 mg auf 100 γ Serumalbumin N keine erheblichen Unterschiede festzustellen sind. 7,4 mg NaOCl lieferte beim Abbau von 200 β Serumalbumin N ungefähr die doppelte Menge CO_2 wie bei halber Dosis. Wenn höhere Dosen Hypochlorit (12,7 mg/100 γ N) keinen stärkeren Abbau ergeben, so scheint das daran zu liegen, daß noch besondere Veränderungen am Proteinmolekül auftreten, die die Reaktion mit den zur Spaltung notwendigen Gruppen verhindern. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse am Globulin, bei denen der Abbau nach Einwirkung von 12,7 mg NaOCl geringer ist als nach 3,7 mg auf 100 γ Protein N. Diese Fragen werden uns an anderer Stelle in Verbindung mit der Bedeutung der Aufarbeitung der Proteine für die Reaktion mit Hypochlorit noch beschäftigen. Die Anwesenheit eines Neutralsalzes scheint jedenfalls für die Geschwindigkeit der Spaltung von Peptidbindungen nicht gleichgültig zu sein, wie der folgende Versuch am Serumalbumin eines Ödemkranken zeigt (Abb. 1).

Die starke Zunahme der Entwicklung von gasförmigem Stickstoff beim Abbau der Proteine in Anwesenheit von Na_2SO_4 ist im Zusammenhang mit Untersuchungen von G. A. Ballou, F. O. Boyer, I. M. Luck und F. G. Lum [21] besonders interessant. Diese Autoren fanden nämlich als Folge von Denaturierung durch Erwärmen oder Aussalzen eine Lösung intermolekularer Kohäsionsbedingungen, wobei vermehrt basische Gruppen in den Seitenketten freigelegt werden. Somit scheint es möglich, mit Hilfe dieser Methode einen Einblick in die bei der fraktionierten Neutralsalzfällung von Serumproteinen gefundenen Veränderungen zu gewinnen.

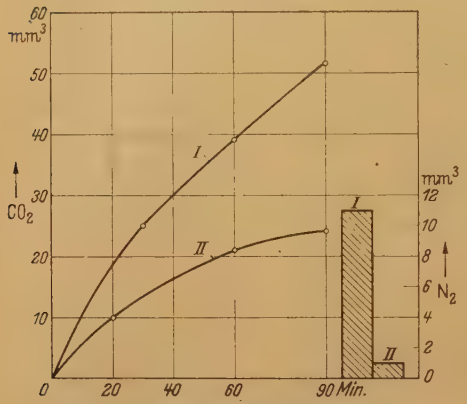


Abb. 1. Gasförmige Stickstoff- und CO_2-Entwicklung nach Einwirkung von 7,4 mg NaOCl auf 200 γ Serumalbumin N eines chronischen Ödemkranken. *I* in m/10 Phosphatpuffer bei Anwesenheit von etwa 10 g-% Na_2SO_4, *II* in m/10 Phosphatpuffer ohne Na_2SO_4.

Wir haben daher in den nächsten Versuchen gleichmäßige Bedingungen eingehalten, in dem wir die zur Fällung benötigten Mengen Neutralsalz durch Dialyse gegen 0,9% NaCl-Lösung entfernten. Die nächste Abbildung enthält vergleichende Messungen an verschiedenen Serumalbuminen (Abb. 2).

Bei diesen Versuchen zeigte sich nun, daß der Abbau des Albumins bei 2 Patienten mit chronischem Hungerödem deutlich langsamer verläuft als bei normalen. Dies spricht auf Grund der an synthetischen Substraten gemachten Erfahrungen für das Vorliegen struktureller Abweichungen in diesem Eiweißanteil Entsprechende Experimente an den Globulinen der gleichen Seren zeigen dagegen einen deutlich anormalen Verlauf nur bei der Nierenerkrankung (Abb. 3).

Der Befund, der natürlich noch an einer größeren Zahl von Untersuchungen sichergestellt werden muß, ist insofern von Interesse, als elektrophoretische Analysen besondere Abweichungen der Lipoideiweißverbindungen im Bereich der Globuline ergeben haben [22]. An anderer Stelle diskutieren F. Wuhrmann und Ch. Wunderly [23] die Möglichkeit, daß physikalisch-chemische Eigenschaften der Lipoide die

[21] Ballou, G. A., P. O. Boyer, J. M. Luck u. F. G. Lum: J. clin. Invest. (Am.) **23**, 454 (1944). — [22] Abramson, H. A., L. S. Moyer u. H. H. Gorin: Electrophoresis of Protein, S. 173. New York 1942. — Wiedemann, E. in Wuhrmann u. Wunderly: Die Bluteiweißkörper des Menschen, S. 110. Basel 1947. [23] Wuhrmann, F. u. Ch. Wunderly: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 251.

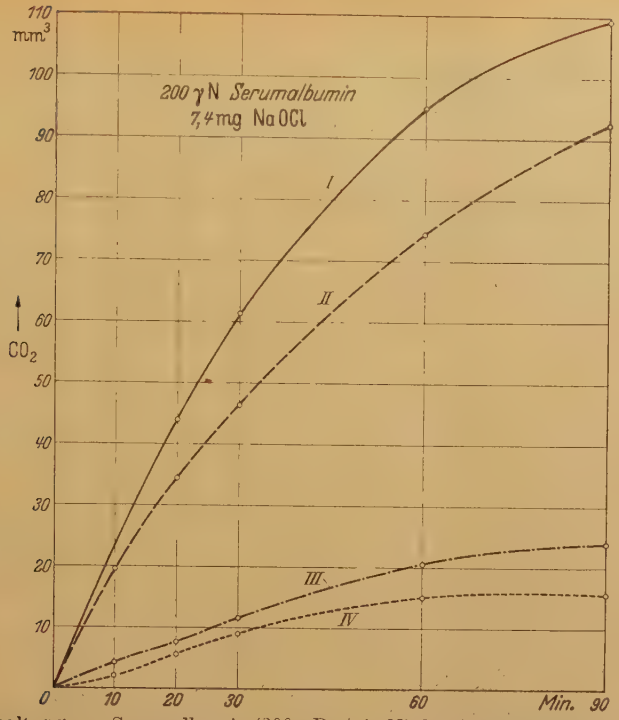


Abb. 2. Spaltung von Serumalbumin (200 γ Protein N) durch 7,4 mg NaOCl. *I* Nephrose; *II* normales Serumalbumin; *III* und *IV* chronische Hungerödeme.

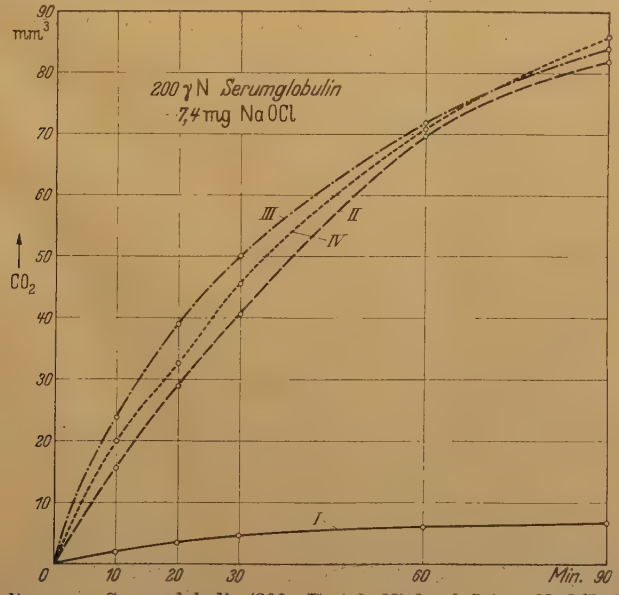


Abb. 3. Spaltung von Serumglobulin (200 γ Protein N) durch 7,4 mg NaOCl. *I* Nephrose; *II* normales Serumglobulin; *III* und *IV* chronische Hungerödeme.

Proteinkomponente des Komplexes durch Faltung der Peptidkette so verändern könne, daß die Gesamtzahl der polaren Gruppen abnimmt. Diese Annahme kann zur Erklärung der auffallend geringen CO_2-Entwicklung nach Einwirken von Hypochlorit auf die von der Nephrose stammenden Globuline mit herangezogen werden.

Diese Auslegung wird noch durch die in Parallelversuchen ermittelten Mengen an gasförmigem Stickstoff gestützt. Bei diesen Experimenten enthielten die Warburg-Gefäße 1 cm³ 10% KOH im vergrößerten Einsatz, die eine schnelle Absorption der gleichzeitig entstehenden Kohlensäure bewirkte. Obwohl die Messung der freigesetzten CO_2-Mengen beim Abbau der Globuline keinen Unterschied zwischen normalen und chronisch Ödemkranken erkennen ließ, scheinen auch hier gewisse Abweichungen zu bestehen, wie aus dem Vergleich des entwickelten gasförmigen Stickstoffs hervorgeht. Daraus ergibt sich eine Übereinstimmung mit früheren auf völlig anderem Wege ermittelten Resultaten [12].

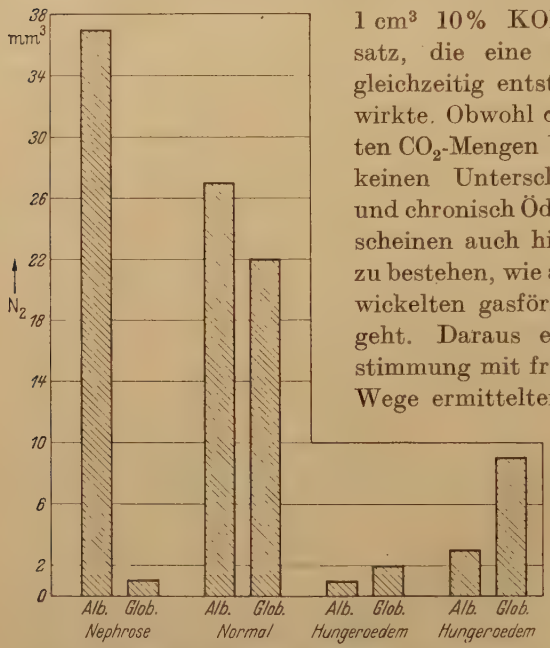


Abb. 4. N_2-Entwicklung nach Zugabe von 7,4 mg NaOCl zu je 200 γ Protein N bei verschiedenen Seren.

In einer früheren Arbeit durchgeführte vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Säureamiden hatten ergeben, daß die Reaktion von Hypochlorit mit der Guanidinogruppe im Arginin sehr wahrscheinlich die Spaltung der Säureamidbindung in dem an der α-Aminogruppe benzoylierten Argininamid katalysiert. Diese Reaktion könnte auch für den Abbau von Proteinen von Bedeutung sein, wenn sie in gleicher Weise auch die Öffnung von Peptidbindungen beeinflußt. Wenn man die beim Abbau von Serumalbumin entwickelten Mengen an gasförmigem Stickstoff zur CO_2-Menge in Beziehung setzt, so scheint das tatsächlich der Fall zu sein; das würde also heißen: je mehr freie Guanidinogruppen vorhanden sind, um so schneller geht die Spaltung von Peptidbindungen vor sich. Hierbei ist allerdings die Einschränkung zu machen, daß der entwickelte N_2 nicht ausschließlich aus der endständigen Gruppe des Arginins stammt. Bei den untersuchten Globulinen liegen die Verhältnisse aber wesentlich

anders, so daß eine endgültige Klärung nur an synthetischen Substraten erfolgen kann.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird man sich die Frage vorlegen, wie sich strukturell abnorme Eiweißkörper im Stoffwechsel verhalten werden. Es liegt heute eine ganze Reihe von Untersuchungen vor, daß die Serumeiweißkörper für die Ernährung der Gewebe wichtig sind.

Besonders schön konnte dies durch Versuche an Hunden mit Hilfe von Lysin, dessen ε-Aminogruppe N^{15} enthielt, bewiesen werden [24]. Lysin ist die einzige Aminosäure, die nicht an der Umaminierung teilnimmt, also keinen Stickstoff von anderen Aminosäuren aufnimmt [25]. Durch Fütterung des etikettierten Lysins gelang eine Anreicherung in den Plasmaproteinen, die nun auf andere Tiere übertragen wurden. Nach einiger Zeit ließ sich der gezeichnete Baustein im Gewebe dieser Tiere nachweisen.

Über das Verhalten der verschiedenen Eiweißkörper im Zellstoffwechsel sind wir vor allem durch Arbeiten von A. Fischer [26] an Gewebekulturen unterrichtet. Bei diesen Untersuchungen war bemerkenswert, daß die Zellen offensichtlich hochmolekulare Spaltstücke eines homologen Proteins besser verwerten können als niedermolekulare. Das spricht für eine *unmittelbare* Verwendung im Stoffwechsel. Dagegen verhält es sich umgekehrt mit den Produkten aus heterologen Proteinen. Aus dem Verhalten der Spaltprodukte aus heterologem Eiweiß, die durch Einwirkung verschiedener Enzyme gewonnen waren, und der Tatsache, daß die verschiedenen Zelltypen derselben Tierart auf die größeren Spaltprodukte heterologen Eiweißes nicht gleichartig reagieren, zog Fischer den Schluß, „daß das Cytoplasma verschiedener Zelltypen einer Tierart nicht nach einem und demselben Muster aufgebaut wird, was im übrigen auch in der Wirkung ihrer Enzyme zum Ausdruck kommt". Die Zellen verfügen jedenfalls nicht über alle für den Eiweißstoffwechsel wichtigen Fermente, wie schon aus der Beobachtung hervorgeht, daß die für den Gesamtorganismus entbehrliche Glutaminsäure für das Wachstum der isolierten Zelle unentbehrlich ist, weil sie diesen Baustein nicht synthetisieren kann.

Verwertet man diese Befunde zur Beantwortung der oben gestellten Frage, so ist anzunehmen, daß strukturell abnorme Eiweißkörper von den Zellen höchstens dann zum Aufbau zelleigenen Proteins verwendet werden können, wenn sie vorher in niedermolekulare Spaltstücke zerlegt werden. Hierfür müßten dann entsprechende spezifische Enzyme zur Verfügung stehen, damit der Austausch der Bausteine im Eiweißmolekül mit der erforderlichen Intensität vor sich gehen kann. Fehlen sie, so würden die hochmolekularen in ihrem Bau abweichenden Proteine, unter der Voraussetzung, daß sie wie normale in die Zellen eindringen, entweder gar nicht oder so langsam abgebaut werden, daß die Bausteine für die rasch verlaufende Erneuerung des Gewebeeiweißes nicht ausreichen. Interessant ist nun, daß bereits morphologische Untersuchungen über das Verhalten heterologer Proteine nach dem

[24] Fink, Enns, Kimball, Silberstein, Bale, Maddee u. Whipple: J. exper. Med. (Am.) 80, 455 (1944). — [25] Schoenheimer, R.: The dynamic state of body constituents. Harvard University Press 1946. — [26] Fischer, A.: Naturw. 30, 665 (1942).

Eindringen in Zellen vorliegen, die allerdings unter anderen Gesichtspunkten vorgenommen wurden. E. Randerath [27] hat in schönen Experimenten zeigen können, daß die Aufnahme plasmafremder Eiweißkörper zum Auftreten hyaliner Tropfen im Tubulusepithel der Niere führt, während normale Serumeiweißkörper keine Veränderungen hervorrufen. Nach Aufhören der Zufuhr plasmafremder Proteine verschwinden die morphologischen Anzeichen der hyalintropfigen Eiweißspeicherung erst im Laufe einiger Tage [28]. Die Resorption dieser in ihrer Struktur von normalen abweichenden Proteinmoleküle ist offenbar nicht gestört. Dagegen scheint der intrazelluläre Abbau langsamer zu verlaufen, weil den Zellen die entsprechenden spezifischen proteolytischen Fermente fehlen.

Bei Untersuchungen über die Spezifität der intrazellulären eiweißspaltenden Fermente wurde z. B. gefunden, daß ein Kathepsin aus der Milz Carbobenzoxy-l-glutaminyl-l-tyrosin in 2 Stunden zu 53% hydrolysiert, Carbobenzoxy-l-glutaminyl-l-glutaminsäure unter gleichen Bedingungen aber nicht spalten kann, sondern erst nach Zusatz eines Aktivators [29]. Ebenso wird l-Glutaminyl-l-Tyrosin, bei dem im Gegensatz zu dem zuerst genannten Substrat eine freie Aminogruppe vorliegt in 4 Stunden nur zu 4%, nach Zugabe des Aktivators Cystin zu 37% gespalten. Diese Beispiele zeigen bereits deutlich den Einfluß der Struktur auf die Spaltungsgeschwindigkeit von Peptidbindungen durch Proteinasen. In analoger Weise gilt dies auch für die auf niedermolekulare Eiweißkörper eingestellten Proteasen [30].

Wie sich der Austausch der Eiweißkörper zwischen Serum und Zelle vollzieht, ist noch nicht genau bekannt. Anscheinend können sämtliche Gewebezellen das Bluteiweiß abbauen unter der Voraussetzung, daß auch Eiweißabbauprodukte vorhanden sind. Doch werden zwischen den einzelnen Zelltypen Unterschiede bestehen, wie schon aus den Untersuchungen von Randerath [27] über die Speicherungsfähigkeit der Tubulusepithelien für Eiweißkörper verschiedener Molekulgröße hervorgeht. Alle diese Hinweise lassen bereits deutlich die schwerwiegenden Folgen erkennen, die das Auftreten abnormer Serumeiweißkörper für die Ernährung der Zellen haben kann, wenn die Störung beim chronischen Ödem in einer fehlgeleiteten Proteinsynthese zu suchen ist.

Zusammenfassung.

Nach Einwirkung von Natriumhypochlorit auf die Serumproteine von Gesunden und Ödemkranken zeigte sich, daß die Abnahme des Gesamtstickstoffs, bedingt durch den Verlust an gasförmigen Stickstoff, bei Patienten mit Hungerödemen wesentlich geringer war. Die Befunde sprechen dafür, daß diese Serumproteine unter den gegebenen Versuchs-

[27] Randerath, E.: Klin. Wschr. **1941**, 281, 305. — [28] Kleier: Beitr. path. Anat. **103**, 559 (1939). Zit. nach E. Randerath. — [29] Bergmann, M. u. F.. S Fruton: Advances in Enzymology, Bd. I, S. 63. 1941. — [30] Herken, H.: Klin. Wschr. **1942**, 601.

bedingungen weniger basische Gruppen aufweisen, die mit Hypochlorit unter Stickstoffentwicklung reagieren können, als normale.

Der Abbau von Serumalbumin und Serumglobulin, die durch Neutralsalzfällung getrennt wurden, konnte nach Einwirkung von Hypochlorit durch Messung von CO_2 und N_2 manometrisch im WARBURG-Apparat verfolgt werden. Nach Ermittlung der zur Spaltung der Peptidbindungen in den Proteinen günstigsten Mengen Hypochlorit und des Ergebnisses, daß die Anwesenheit von Neutralsalzen für die Reaktion der Proteine mit Hypochlorit von Bedeutung ist, wurden manometrische Messungen an Serumalbuminen und Globulinen unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß der Abbau des Serumalbumins gemessen an der CO_2-Entwicklung bei 2 Patienten mit chronischem Hungerödem deutlich langsamer verlief als bei normalen. Auch die entwickelte Menge N_2 lag sehr viel niedriger. Entsprechende Experimente an den Globulinen der gleichen Seren ergaben einen deutlich anormalen Verlauf nur bei einer Nephrose. Der Vergleich der ermittelten Mengen an gasförmigem Stickstoff ließ jedoch erkennen, daß die Globuline bei chronisch Ödemkranken ebenfalls verändert sind.

Die auf Grund früherer Versuche mit Monobenzoylargininamid aufgeworfene Frage, ob die Reaktion von Hypochlorit mit der Guanidinogruppe des Arginins auch Spaltungen von Peptidbindungen in den Proteinen katalysiert, konnte nicht endgültig geklärt werden.

Alle Untersuchungen sprechen für das Vorkommen abnormer Strukturen in den Serumproteinen, besonders den Serumalbuminen, bei chronisch Ödemkranken. Die Bedeutung der daraus für die Ernährung der Zellen entstehenden Folgen wird besprochen.

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biophysik in Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. B. Rajewsky) und aus dem Paul-Ehrlich-Institut in Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. R. Otto).

Über die Denaturierung der Serumeiweißkörper durch Ultraschall und Wärme mit besonderer Berücksichtigung der Komplementfunktion.

Von

Justus Lehmann und Gerta Finsterwalder.

(Eingegangen am 10. Juni 1948.)

Einleitung.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse einer Untersuchung über die Einwirkung von Ultraschall (US) auf die Serumeiweißkörper beschrieben und mit den Veränderungen nach Erwärmung verglichen. Die Problemstellung interessierte besonders, da der Mechanismus der therapeutischen US-Wirkung noch ungeklärt ist. Wir wählten als Untersuchungsobjekt das Meerschweinchenserum, da dieses durch seine Komplementfunktion eine biologische Testreaktion auf die Zerstörung der Serumeiweißkörper anzuwenden erlaubt. Die biologische Auswertung hielten wir für besonders geeignet, weil sie bereits ablesbare Resultate in der ersten Phase der Eiweißdenaturierung gibt. Dazu kam, daß es lohnend schien, die Zerstörung des Komplementes durch Wärme- und Ultraschalleinwirkung näher kennenzulernen und zu vergleichen. Es bestand die Aussicht, daß damit eine Reihe bisher ungeklärter serologischer Tatsachen ihre Deutung finden konnte.

Methodik.

Als Apparatur benutzten wir einen auf Vorschlag von Prof. Rajewsky angefertigten US-Generator mit auswechselbaren Frequenzen. Die Hochfrequenzspannung am Quarz betrug 1000 Volt, der Anodenstrom 150 mA. Als Gefäß, in dem die Lösungen beschallt wurden, verwandten wir ein Gläschen mit dünnem planparallelgeschliffenen Boden. Die Entfernung des Gefäßbodens vom Quarz betrug ein ganzes Vielfaches der halben US-Wellenlänge. Somit wurde maximale Schalldurchlässigkeit bei minimaler Reflexion am Gefäßboden erreicht. Die Schallintensitätsbestimmung im Gläschen erfolgte kalorimetrisch und mit dem Schallradiometer. Sie lag bei 1 Watt cm^{-2}.

Das Komplement des Meerschweinchenserums wurde mit der in der Serologie üblichen Methode in den Verdünnungen 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20 und 1 : 40 getestet. Das beschallte Flüssigkeitsvolumen wurde konstant auf 5 cm^3 gehalten.

Zur Feststellung der Veränderung der Serumeiweißkörper wurde das eine Mal die Viskosität mittels der Durchlaufszeit durch eine Kapillare gemessen. Der

Fehler betrug ± 0,8 Sek. für je ein Komplement. Die Variabilität verschiedener Komplemente war so groß, daß Vergleiche quantitativer Art nur zwischen den Verdünnungen eines und desselben Komplementes erlaubt waren. Einer weitergehenden Auswertung der Resultate der Viskositätsmessung stellten sich außerdem die bekannten prinzipiellen Schwierigkeiten dieser Methode im Falle hochpolymerer Moleküle entgegen. Weiter benutzten wir die jodometrische Titration von reduzierenden SH-Gruppen, wie sie durch Spaltung von Disulfidbindungen auftreten. Es wurde jeweils die prozentuale Zunahme des Ausgangswertes errechnet. Der Fehler betrug ± 1,4%. Im übrigen gilt für die Variabilität der einzelnen Komplemente das oben gesagte. In den unten zu schildernden Versuchen, in denen die Komplemente durch US oder Wärme behandelt und anschließend die Viskositäts- und SH-Gruppenmessungen durchgeführt wurden, zeigte sich, daß eindeutige Veränderungen der SH-Gruppen und der Viskosität auftraten und mit der Zerstörung des Komplementes, getestet im hämolytischen System, parallel gingen. Wir möchten an dieser Stelle bemerken, daß die Zerstörung nicht plötzlich vor sich geht, sondern allmählich entsprechend der Stärke und der Dauer der Einwirkung. Wir wählten lediglich die Bedingungen immer so, daß am Ende der Versuche gerade die Komplementfunktion verschwunden war.

Da Komplement ohnehin durch Erwärmung zerstört wird, mußte während der Beschallung die Temperatur genau verfolgt werden. Es war darauf zu achten, daß Erwärmung auf Zerstörungstemperatur nicht auftrat. Die Temperaturmessung wurde während der Beschallung mit einem Quecksilberthermometer ohne Abschaltung des US-Generators durchgeführt, nachdem Versuche ergeben hatten, daß der abgelesene Wert regelmäßig 3° höher lag als nach Abschaltung des US. Der Unterschied der abgelesenen Werte kommt dadurch zustande, daß laufend am Thermometer US-Schwingungen in Wärme umgewandelt wurden. Durch Kühlung des Ölbades konnte sicher verhindert werden, daß der Wärmezerstörungspunkt des Komplementes erreicht wurde. Derselbe wurde für jedes Komplement in der entsprechenden Verdünnung durch gradweise Einstellung in Wasserbädern für die Beschallungszeit ermittelt.

Versuche.

Als erste Frage war zu klären, ob US überhaupt eine zerstörende Wirkung auf die Komplementfunktion des Meerschweinchenserums ausübte und wie groß dieselbe war. Da Komplement wärmeempfindlich ist lag es nahe, die Abhängigkeit der US-Wirkung von der Beschallungstemperatur zu prüfen.

In der ersten Versuchsreihe wurden 20 verschiedene Mischkomplemente in der üblichen Gebrauchsverdünnung von 1 : 10 $^1/_2$ Stunde mit einer Frequenz von 3000 kHz und bei einer Temperatur zwischen 23° und 45° beschallt. Die jeweilige Temperatur wurde beim einzelnen Komplement während der Beschallung konstant gehalten. Nach Beendigung des Versuches waren 11 Komplemente zerstört, bei denen die Beschallungstemperatur zwischen 45 und 37° lag. Sie hatten ihre Funktion eingebüßt, während die anderen 9 bei niedrigeren Beschallungstemperaturen unverändert blieben.

Weiter beschallten wir 2 Proben jeweils desselben Komplementes in der Verdünnung 1:10 hintereinander mit den Frequenzen von 1000,

2000 und 3000 kHz $^1/_2$ Stunde, das eine Mal 10° unter dem Wärmezerstörungspunkt gehalten, das andere Mal 1—4° darunter. In 12 derartigen Versuchen zeigte sich, daß bei 1—4° unterhalb der Wärmezerstörung ein völliges Ausbleiben der hämolytischen Funktion erzielt wurde, indessen alle Komplemente während der Beschallung 10° unter dem Wärmezerstörungspunkt unverändert blieben.

Die Resultate dieser Versuchsreihen begründeten die Annahme, daß zur Zerstörung des Komplementes durch US der benutzten Intensität Voraussetzung ist, daß eine kalorische Erwärmung etwas unterhalb der Wärmezerstörungstemperatur stattfindet.

Weiterhin wurde festgestellt, um wieviel Grade man ein Komplement über die Beschallungstemperatur hinaus erwärmen mußte, um die gleiche zerstörende Wirkung zu bekommen. Es wurde also die US-Wirkung quantitativ mit einer Wärmeeinwirkung verglichen. Der Wärmezerstörungspunkt des Komplementes in Wasserbädern wurde ermittelt, dann dasselbe Komplement in der Verdünnung 1 : 10 $^1/_2$ Stunde lang mit 3000 kHz mehrmals hintereinander beschallt, wobei sich die Temperaturen während jeder einzelnen Beschallung um je 1° unterschieden. Es wurde dann festgestellt, bei welcher Temperatur der Beschallung und des Wasserbades die hämolytische Funktion des Komplementes verschwunden war. Die Differenz der Temperaturen in Grad Celsius ergab die US-Wirkung.

Das Resultat von 25 Versuchen dieser Art ergab eine US-Wirkung, die mit einer Erwärmung um durchschnittlich 5,4° über die Beschallungstemperatur hinaus vergleichbar war. Die Variabilität der Empfindlichkeit der einzelnen Komplemente war sehr groß, so daß die US-Wirkung bei den 25 Versuchen für die einzelnen Komplemente zwischen 0,5 und 9° schwankte.

Eine Frequenz von 2000 kHz entsprach im Mittel einer Erwärmung um 3,8°; 1000 kHZ nur 1,8°. Die US-Wirkung nahm also mit fallender Frequenz ab.

In einer Versuchsreihe prüften wir bei 20 Komplementen die prozentuale Veränderung der SH-Gruppen durch US-Einwirkung. Die Temperatur während der Beschallung lag 3—4° unter dem Zerstörungspunkt. Die Beschallung jeder einzelnen Verdünnung erfolgte $^1/_2$ Stunde lang mit einem Quarz von einer Frequenz von 3000 kHz. Nach Beendigung des Versuches war das Komplement zerstört. Die Änderung der Viskosität wurde als Abnahme der Durchlaufzeit durch die Kapillare in Sekunden angegeben. Den Mittelwert der Ergebnisse zeigt Tabelle 1 1a, b.

Nach diesen Versuchen nehmen durch US-Einwirkung die SH-Gruppen zu und die Viskosität ab. Es scheint, daß die stärkste Wirkung bei der Verdünnung 1 : 10 liegt.

Eine weitere Serie von 20 Komplementen wurde $^1/_2$ Stunde im Wasserbad auf Zerstörungstemperatur (52°) erwärmt. Die Ergebnisse entsprechen denen nach Beschallung: Tabelle 1 2a, b.

Tabelle 1. (In den Spalten a ist die prozentuale SH-Gruppenzu- oder -abnahme und in den Spalten b die Viskositätsänderung der Lösung durch die Abnahme der Durchlaufszeit durch die Kapillare in Sekunden angegeben.)

	Verdünnung des Komplements mit 0,94% NaCl-Lösung					
	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 15	1 : 20	1 : 40
1a	+50,1%	+59,2%	+96,8%	+55,8%	+50,5%	+34,8%
1b	−9,1sec	−7,7sec	−6,7sec	−2,5sec	−2,3sec	—
2a	+21,3%	+26,0%	+39,7%	+26,0%	+25,8%	+10,0%
2b	−6,0sec	−4,5sec	−4,5sec	−1,0sec	−2,0sec	—
3a	+26,0%	+47,7%	+51,5%	+22,4%	+28,7%	+23,6%
3b	−0,5sec	−6,6sec	−7,3sec	−4,4sec	−0,9sec	—
4a	+13,2%	+11,0%	+5,6%	+1,4%	+0,6%	—

In einer weiteren Reihe wurden 10 Versuche in der oben beschriebenen Form durchgeführt, nur wurde von denselben Komplementen die SH-Gruppenzunahme und Viskositätsabnahme nach Einbringen in ein Wasserbad von Beschallungstemperatur für $^1/_2$ Stunde ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden von dem Ergebnis der Serumveränderung nach Beschallung abgezogen. Das Resultat konnte man als reine US-Wirkung auffassen (s. Tabelle 1 3a, b).

Es zeigt sich also auch hier: US- und Wärmeeinwirkung unterscheiden sich nicht; bei beiden scheint eine stärkere Wirkung auf die Eiweißkörper in der Verdünnung 1 : 10 vorzuliegen.

In 5 weiteren Versuchen benutzten wir statt physiologischer Kochsalzlösung isotonische Harnstofflösung und bestimmten wiederum die prozentuale SH-Gruppenzunahme nach Erwärmung auf Zerstörungstemperatur für $^1/_2$ Stunde. Das Ergebnis war: 1 : 1 = 32%, 1 : 5 = 35%, 1 : 10 = 36%, 1 : 15 = 36% und 1 : 20 = 18%.

Es war also auch hier ein ähnliches Verhalten angedeutet. Daß die Veränderungen geringer waren als bei den oben beschriebenen Versuchen, führen wir auf die schon primär desaggregierende Wirkung des Harnstoffes auf Eiweißkörper zurück.

Weiter wurde untersucht, ob sich bei niedrigen Temperaturen die gleiche Abhängigkeit der zerstörenden Wirkung von der Verdünnung nachweisen ließ. Natürlich mußte länger gewartet werden, als bei Temperaturen um 50°. Von 10 Komplementen wurden Verdünnungen bei Temperaturen etwas unter 0° in den Eisschrank gebracht. Die Temperatur wurde so gewählt, daß die Lösungen gerade nicht gefroren waren. Nach 5 Tagen wurde untersucht: Tabelle 1 4a. Bei niedrigen

Tabelle 2. (In den Spalten a ist die prozentuale SH-Gruppenzu- oder -abnahme der Durchlaufszeit durch eine

	Zeit in			
	20	40	60	80
1a	+12,2%	+16,6%	+13,4%	+0,5%
1b	−6,5sec	−14,5sec	—	+20,0sec
2a	+7,0%	+14,0%	+5,4%	+6,0%
2b	−4,4sec	−4,5sec	—	−5,5sec

Temperaturen tritt die stärkste Änderung der Serumproteine demnach nicht mehr in der Gegend der Verdünnung 1 : 10, sondern bei 1 : 1 auf.

Die gleichen Komplementverdünnungen wurden eingefroren und bei derselben Temperatur wie oben 5 Tage und länger im Eisschrank aufbewahrt. Die Temperatur lag auch hier etwas unter 0°, so daß die Lösungen der einen Versuchsreihe bei derselben Temperatur gerade noch flüssig, und die der anderen gerade noch gefroren blieben. Nach Auftauen zeigte sich weder eine Änderung der Viskosität noch eine Änderung der SH-Gruppen, die über die Fehlerbreite hinausging. Die Komplementfunktion blieb erhalten.

Für die Betrachtung der Zerstörung des Komplementes in den einzelnen Verdünnungen war es wesentlich zu wissen, inwieweit sich die Serumeiweißkörper allein durch Verdünnung änderten. Wenn die Sulfhydrilgruppen als Cystein in Milligrammprozent auf 1 : 1 umgerechnet wurden, ergab sich: 1 : 1 = 99,5 mg-%, 1 : 5 = 82,2 mg-%, 1 : 10 = 110 mg-%, 1 : 15 = 129,2 mg-%, 1 : 20 = 123,8 mg-%, 1 : 40 = 170,8 mg-%. Es zeigte sich, daß durch die Verdünnung die Sulfhydrilgruppen zunahmen, dabei aber starke Schwankungen auftraten.

Um den zeitlichen Ablauf der Veränderungen zu beobachten, wurden zwei Komplemente ohne Verdünnung über 200 Min. beschallt, wobei die Temperatur während der Beschallung 5° unter dem Zerstörungspunkt von 52° lag. Alle 20 m wurde die prozentuale SH-Gruppenzunahme und die Viskositätsänderung alle 40 m gemessen. Die Schallfrequenz betrug 3000 kHz. Als Mittel ergaben sich die Werte in Tabelle 2 1a, b. Nach 40 m war die Komplementfunktion verschwunden.

Zwei weitere Komplemente wurden in ein Wasserbad von 52° gebracht. Die Ergebnisse s. Tabelle 2 2a, b. Aus ihnen folgt, daß die Zerstörung der Eiweißkörper des Serums durch US- und Wärmeeinwirkung in 2 Phasen verläuft. Zunächst nehmen die SH-Gruppen zu und die Viskosität ab. Dann nimmt die Viskosität zu und die SH-Gruppen ab.

Zum Schluß untersuchten wir, ob der geschilderte Phasenablauf durch das Hinzufügen von anderen Makromolekülen, wie Periston und Agar-Agar, geändert werden konnte. Unter Wahrung der Isotonie und des p_H wurden daher Verdünnungen von Komplementen mit physio-

und in den Spalten b die Viskositätsänderung der Lösung durch die Abnahme Kapillare in Sekunden angegeben.)

Minuten					
100	120	140	160	180	200
−6,0%	−7,5%	−12,5%	−12,5%	−12,5%	−12,5%
—	+40,0sec	—	+58sec	—	+167sec
−6,9%	−13,9	−13,9%	−13,9%	−16,5%	−13,9%
—	+16,5sec	—	+56,6sec	—	+120sec

logischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10 unter Zusatz von etwa 0,5% Agar-Agar hergestellt. Periston (Polyvinylpyrrolidon) wurde unmittelbar als Lösungsmittel benutzt. Kontrollen wurden ohne Makromoleküle der gleichen Wärme- und US-Einwirkung ausgesetzt. Das Resultat lautete (s. Tabelle 3):

Tabelle 3.

US-Wirkung	Mit Periston	Mit Agar	Kontrolle	Wärmewirkung (52°)	Mit Periston	Mit Agar	Kontrolle
m	%	%	%	m	%	%	%
10	+ 20	+ 36	+ 0	10	+ 23	+ 6,6	+ 21
20	+ 10	+ 48	+ 6	20	+ 7	+ 27,6	+ 21
30	+ 0	+ 44	+ 23	30	+ 0	+ 2,2	+ 30
40	+ 0	+ 33	+ 6	40	+ 0	+ 2,2	+ 21
50	+ 0	+ 33	+ 6				

Der Phasenablauf der Veränderung der beschallten Lösungen wurde also beschleunigt. Wärmeeinwirkung lieferte dasselbe Ergebnis. Die höchsten Zunahmen der Sulfhydrilgruppen waren in Anwesenheit von Periston etwas geringer als ohne diese Makromoleküle. Mit Agar-Agar waren die Zunahmen größer. Nun waren aber in der Volumeneinheit wesentlich mehr Peristonmoleküle als Agar-Agarmoleküle. Dementsprechend war auch der Einfluß des Peristons im zeitlichen Ablauf stärker als der von Agar-Agar. Wir möchten annehmen, daß bei Periston die Sulfhydrilgruppenzunahme infolge des sehr raschen Phasenablaufs durch die 2. Phase überdeckt wurde.

Sämtliche bisher geschilderten Ergebnisse der US-Versuche waren davon unabhängig ob entgaste oder nicht entgaste Flüssigkeiten benutzt wurden. Gegen die Annahme, daß die Entgasung beim Zustandekommen der Wirkung wesentlich beteiligt ist, spricht außerdem, daß der Quarz von der Frequenz von 3000 kHz, die stärkste Wirkung hatte. Bekanntlich tritt die Entgasung um so stärker auf, je niedriger die Frequenz des US ist.

Besprechung der Ergebnisse.

Zunächst müssen wir uns damit auseinandersetzen, ob wir nicht durch US lediglich eine Wärmewirkung erzielt haben, da sich eine

weitgehende Ähnlichkeit der Veränderungen nach US und Wärme ergeben hat. Außerdem mußte die Temperatur während der Schalleinwirkung unserer Intensität nur etwa 5^0 unter dem Wärmezerstörungspunkt des Komplementes liegen, damit volle Wirkung auftrat. Zwar konnten wir sicher kontrollieren, daß die Wärmezerstörungstemperatur nicht erreicht wurde, doch treten bei der US-Welle in den Kompressionsstellen zusätzliche Erwärmungen auf. Wegen seiner großen Abmessungen und seiner erheblichen Trägheit kann das Quecksilberthermometer nur einen Mittelwert zwischen den Temperaturen in Wellenknoten und -bauch messen. Die experimentelle Ermittlung dieser Temperaturunterschiede war bei den von uns verwandten hohen Frequenzen meßtechnisch nicht durchführbar. Nach den Arbeiten von BÜCKS, MÜLLER, MÜLLER und KRAEFFT, WETZMANN liegen die Temperaturunterschiede bei niedrigen Frequenzen nicht in Größenordnungen, die für die Wirkung in Betracht kommen.

Um die meßtechnischen Schwierigkeiten zu umgehen, haben wir die absoluten Temperaturerhöhungen im Wellenknoten rechnerisch ermittelt. Die ganze Überlegung wurde als Maximumsrechnung durchgeführt. Es sollte damit der Einwand ausgeschaltet werden, daß geringe Abweichungen beim rechnerischen Ansatz von den tatsächlichen Vorgängen zu Fehlwerten geführt hätten. Nur so konnte man aus dem Resultat sicher entscheiden, ob der sog. Knoteneffekt im Bereich der niedrigsten experimentell ermittelten Temperatur von $0{,}5^0$ lag.

Wir haben angenommen, daß der Quarz von seiner maximalen Kontraktions- zur maximalen Dilatationslage vorschwingt, d. h. um die zweifache Amplitude $= 2\,a$. Bei unserer Versuchsanordnung beträgt a größenordnungsmäßig 10^{-6} cm. Während der Quarz von der Kontraktion zur maximalen Dilatation vorgeschwungen ist, hat sich die Kompressionswelle im Medium um $\lambda/2$ ($\lambda =$ Wellenlänge) ausgebreitet. Nehmen wir nun an, daß sich hier eine starre Wand befindet, d. h. daß die nachfolgende Flüssigkeitssäule unnachgiebig wäre, so wäre das Volumen von $\frac{\lambda}{2} \cdot 1\,\text{cm}^2$ um $2\,a \cdot 1\,\text{cm}^2$ komprimiert worden. Bei bekannter Kompressibilität der Flüssigkeit läßt sich nach dem HOOKEschen Gesetz die Kraft auf den Querschnitt, und daraus wieder Kraft mal Weg, d. h. die Arbeit (A) berechnen. Wenn V das Volumen, ΔV die Volumenänderung des zu komprimierenden Mediums bedeutet, und K die Kraft, Q den Querschnitt und X den Kompressionsmodul, so ergibt sich:

$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{K}{Qx} \quad \text{und da} \quad \frac{K}{Q} = P,\ P = \frac{\Delta V}{V}\, x.$$

Mit den oben gegebenen Daten ergibt sich größenordnungsmäßig $P = 10^6$ dyn cm ^{2} und $A = 10$ erg. Über das mechanische Wärmeäquivalent ergibt sich eine Erwärmung des komprimierten Volumens um 10^{-7} cal. Das bedeutet: Der Temperaturunterschied zwischen der Durchschnittstemperatur, die wir mit dem Thermometer gemessen haben, und der Temperatur im Wellenknoten beträgt größenordnungsmäßig 10^{-4} –10^{-5} Grad. Wenn die vorliegende Rechnung auch nur

eine grobe Schätzung darstellt, so sind doch auf der anderen Seite alle Ansätze so gewählt, daß die maximal mögliche Erwärmung berechnet wurde.

Es zeigt sich also, daß die von uns beschriebenen Veränderungen der Serumeiweißkörper und der Komplementfunktion nach der US-Einwirkung nicht durch Erwärmung hervorgerufen sein können. Wie wir gesehen haben, wird durch US- und Wärmeeinwirkung in der 1. Phase des Geschehens die Komplementfunktion zum Verschwinden gebracht, die Sulfhydrilgruppen nehmen zu und die Viskosität der Lösung nimmt ab. Dieses Verhalten deuten wir dahin, daß Eiweißmoleküle des Serums durch Zerbrechen der Makromoleküle denaturiert werden, wobei die Disulfidbrücken aufgespalten und damit reduzierende SH-Gruppen frei werden. Durch die abnehmende Molekülgröße wird die Viskosität vermindert. In der 2. Phase des Geschehens tritt eine Viskositätszunahme und SH-Gruppenabnahme auf. Wir nehmen an, daß sich die zerschlagenen Makromoleküle zusammenballen, also eine Koagulation eintritt; dadurch nimmt die Viskosität zu und die SH-Gruppen sind nicht mehr frei zugänglich. Der Phasenablauf des Geschehens wird durch Hinzufügen anderer Makromoleküle, wie Polyvinylpyrrolidon oder Agar-Agar beschleunigt.

Schon vor längerer Zeit hat Rajewsky zeigen können, daß die Denaturierung der Eiweißkörper durch Röntgenstrahlen und ultraviolettes Licht in 3 Phasen verläuft. Er unterschied 1. die Denaturierung, 2. die Koagulierung und 3. die Ausflockung der Teilchen. Ebenfalls in 2 Phasen verläuft nach Heymann und Seelich die Hitzedenaturierung. Auch nimmt man nach neueren amerikanischen Arbeiten an, daß oft der 1. Schritt der Eiweißdenaturierung in einer Dissoziation besteht, und daß diesem erst die Aggregation, d. h. die Koagulation folgt.

Unsere Ergebnisse stimmen somit durchaus mit denen der Literatur überein, nur ist augenscheinlich die zeitliche Trennung der beiden Phasen bei den Labileiweißen des Meerschweinchenkomplementes besonders ausgeprägt.

Deutung der Ergebnisse.

Stellen wir uns auf den Standpunkt, daß die Zerschlagung der Eiweißmoleküle nach US- und Wärmeeinwirkung durch den Zusammenstoß der Makromoleküle untereinander zustande kommt, so können wir annehmen, daß die Wirkung der Zusammenstöße infolge ungeordneter Molekularbewegung durch die gerichtete Schwingung der Moleküle im US-Feld verstärkt wird. Damit wäre die Erklärung dafür gefunden, warum zur Zerstörung des Komplementes durch US die Temperatur während der Beschallung nur wenige Grade unter dem Wärmezerstörungspunkt des Komplementes liegen darf.

Die US-Wirkung war bei den einzelnen Seren vergleichbar mit einer Erwärmung zwischen 0,5° und 9°. Wenn unsere Annahme über den Zerstörungsmechanismus der Serumeiweißkörper stimmen sollte,

so mußte die Schwingungsenergie der Makromoleküle im US-Feld größenordnungsmäßig der mittleren kinetischen Energie eines Moleküls infolge der Wärmebewegung bei einer Temperatur von 0,5—9° entsprechen.

Um festzustellen, ob das tatsächlich der Fall war, führten wir folgende Rechnung durch. Zunächst ermittelten wir aus der Formel für die Intensität des US die Maximalamplitude (x) der Schwingung. Die Intensität ist

$$I = \frac{\varsigma\, c}{2} \cdot \omega^2\, x^2,$$

wobei I die Intensität (erg cm ^{2} sec^{-1}), ς die Dichte des Mediums (g · cm ^{3}), c die Schallgeschwindigkeit im Medium (cm · sec^{-1}) und x die Maximalamplitude (cm) bedeutet, während $\omega = 2\,\pi\, n$ gleich der Kreisfrequenz ist; n bedeutet die Schwingungszahl (Hz); x entspricht in unserem Falle, d. h. bei einer Schalleistung von 1 Watt cm^{-2}, größenordnungsmäßig 10^{-6} cm. Nach der Schwingungsgleichung ist: $x_1 = x \cdot \sin \omega\, t = x \cdot \sin 2\pi n t$, wobei x_1 die veränderliche Amplitude bedeutet. Wird dieselbe nach der Zeit differenziert, so erhält man die Amplitudengeschwindigkeit

$$\frac{dx_1}{dt} = 2\pi\, n\, x \cdot \cos(2\,\pi\, n\, t).$$

Die maximale Amplitudengeschwindigkeit ist $x_0 = 2\pi\, n\, x$. Setzen wir den oben ermittelten Wert für x ein, so ist $x_0 \approx 20$ cm sec^{-1}. Bei der ebenen Schallwelle ist nun die Energiemenge, die in der Zeiteinheit senkrecht durch die Flächeneinheit hindurchtritt, gleich der Intensität. Die Gesamtenergie des schwingenden Volumenelementes ΔV ist konstant und beträgt: $\Delta E = E$ kin. $+ E$ pot. $=$ konst. $= E$ kin. (max). Nehmen wir nun weiter an, daß die Moleküle mit der maximalen Amplitude im Schallfeld mitschwingen, so beträgt die Schwingungsenergie: E kin. max. $= 1/2\, m x_0{}^2$. Unter Benutzung des oben angegebenen Wertes von x_0 ergibt sich für die Masse eines Wassermoleküls ($3 \cdot 10^{-23}$ g): E kin. max. $\approx 6{,}0 \cdot 10^{-21}$ erg. Die mittlere Energie der Moleküle bei der Wärmebewegung beträgt aber $E = 3/2\, K\, T$*, wobei K gleich der Boltzmannschen Konstanten ($1{,}3708 \cdot 10^{-16}$ erg Grad^{-1}) ist. T bedeutet die absolute Temperatur. Wenn wir also die Schwingungsenergie eines Wassermoleküls beim US mit der mittleren Bewegungsenergie bei der Erwärmung um 1° vergleichen, so entspricht größenordnungsmäßig die Schwingungsenergie des Moleküls im US-Feld der Erwärmung um 10^{-6} bis 10^{-5} Grad. Betrachten wir aber nicht die Schwingungsenergie der Wassermoleküle, d. h. des Lösungsmittels, sondern die Schwingungsenergie der Eiweißmoleküle, so erhalten wir wesentlich höhere Werte. Nehmen wir als Molekulargewicht der Serumalbumine und Globuline eine Größenordnung von 100000—300000 an, so erhalten wir bei der gleichen Betrachtung eine Schwingungsenergie, die einer mittleren kinetischen Energie bei einer Erwärmung um einige Grade (etwa 1,0—0,1°) entspricht. Vergleichen wir diese Werte mit der von uns experimentell ermittelten US-Wirkung, die vergleichbar war mit einer Erwärmung von 0,5—9°, so stimmen dieselben größenordnungsmäßig überein. Berücksichtigen muß man ferner noch, daß es durchaus möglich ist, daß die für die Komplementfunktion verantwortlichen Labileiweißkörper ein höheres Molekulargewicht haben als es in unserer Rechnung angenommen ist, so würde die Übereinstimmung der Werte noch besser werden.

Wesentlich für unsere Betrachtung ist allerdings die Annahme, daß auch die Moleküle mit der vollen Amplitude in der US-Welle mitschwingen. Nach

* Die klassische Theorie ergibt für Flüssigkeiten den doppelten Wert von $6/2\, K\, T$.

Hiedemann sowie Bergmann gibt folgende Formel die Schwingungsamplitude eines Teilchens x_0, wobei bei einem kugelförmigen Partikel r den Radius, ς die Dichte, x die Amplitude des schwingenden Mediums bedeutet; n sei die Frequenz, η die Zähigkeit.

$$x_0 = \frac{x}{\sqrt{\left(\frac{4\,\pi\,\varsigma\,r^2\,n}{9\,\eta\,F}\right)^2 + 1}},$$

wobei $F = \left(1 + \frac{Al}{r}\right)$ ist; 1 bedeutet die freie Weglänge, A den Cunninghamschen Korrekturfaktor.

Wenn wir diese Gleichung, die für Gase abgeleitet wurde, auf die Verhältnisse bei unseren Versuchen übertragen dürfen, so zeigt sich, daß die Eiweißmoleküle praktisch mit der vollen Amplitude des Mediums mitschwingen. Setzen wir nämlich größenordnungsmäßig $r = 10^{-6}$ cm, $\varsigma = 1$ g cm^{-3} und $\eta = 0{,}01$ cm^{-1} g sec^{-1}, so wird die Wurzel im obigen Ausdruck praktisch 1.

Unser Deutungsversuch nimmt also an, daß die Zusammenstöße der Makromoleküle untereinander, die infolge der Wärmebewegung stattfinden, durch die US-Einwirkung verstärkt werden.

Für eine Erwärmung ist es selbstverständlich, daß die Zusammenstöße der Moleküle untereinander vermehrt und verstärkt werden. Beim US muß man berücksichtigen, daß die Dimensionen der freien Weglänge klein gegenüber der Wellenlänge sind. Demnach schwingen alle Moleküle eines Bezirkes mit annähernd gleicher Amplitude. Als Beleg dafür, daß tatsächlich Zusammenstöße vermehrt vorkommen, können wir die Untersuchungen über Aerosole und Hydrosole von Brand, Hiedemann, sowie Wiegener und Tuorila, Brand und Freund und anderen Autoren anführen. Auch bei den Untersuchungen dieser Autoren war die Partikelgröße und die freie Weglänge gegenüber der Wellenlänge klein. Zur Klärung der durch Zusammenstöße stattfindenden Aggregation nahmen Taturn und die oben angeführten Autoren an, daß infolge der verschiedenen Teilchengröße dieselben verschieden mit der Schallwelle mitgingen und sich so die Wahrscheinlichkeit der Zusammenstöße vermehrte. Auch bei dem von uns untersuchten Medium besteht eine erhebliche Heterogenität. Allerdings muß man berücksichtigen, daß infolge der geringen Maße der Teilchen der Unterschied beim Grad des Mitschwingens nach der früher angeführten Formel wahrscheinlich nur gering ist. Es muß demnach offen bleiben, ob diese Erscheinung quantitativ zur Zerstörung der Eiweißkörper ausreicht.

Partikel von molekularen Dimensionen haben infolge der Wärmemolekularbewegung nicht nur völlig verschiedene, sondern auch nach allen Seiten gerichtete Geschwindigkeiten. Dazu kommt dann die gerichtete Bewegung der Wasserteilchen durch die US-Welle. Man kann sich denken, daß die von der US-Welle bewegten Moleküle mit den anderen sich nicht weiter als im Abstand einer freien Weglänge befindenden Teilchen, die von der Welle noch nicht oder in geringerem Maße erfaßt sind und in entgegengesetzter Richtung laufen, stärker zusammenstoßen werden. Die US-Energie kann dabei zum Teil verbraucht werden. Wenn man annimmt, daß zur Zerstörung der Moleküle ein bestimmter Grenzwert der Stärke der Zusammenstöße überschritten werden muß, so kann man sich vorstellen, daß das eben beschriebene Phänomen eine Wirkung erzielen kann. Tatsächlich wurde bei der Beschallung die Temperatur jeweilig so gewählt, daß sie eben zur Zerstörung der Komplementfunktion des Serums nicht ausreichte, d. h. daß im wesentlichen die Zusammenstöße unterschwellig blieben. Man kann annehmen, daß durch die Einwirkung von US der Schwellenwert der Energie der

Zusammenstöße überschritten wurde und eine Zerstörung der Moleküle erfolgte. Damit scheint eine zweite Möglichkeit zur Verstärkung der Wirkung gegeben. Allerdings kann man auch daraus quantitative Schlußfolgerungen nicht ziehen.

Als letztes kommen für diese Überlegungen die von Kneser und anderen untersuchten Relaxationserscheinungen in Betracht. Bei der sehr raschen Kompression eines Mediums, wie sie beim US erfolgt, wird fast die gesamte zugeführte Energie zunächst nur durch die äußere Translationsenergie der Moleküle übernommen, da die innere Energie eine endliche Einstelldauer hat. Kneser konnte zeigen, daß im US-Gebiet der größte Teil der Schallabsorption auf dieser molekularen Absorption beruht. Die Relaxationszeit und die Zahl der zum Energieausgleich notwendigen Zusammenstöße schwankte nach Art der Moleküle erheblich. Die Theorie der Relaxationserscheinung ist leider noch nicht so weit ausgebaut, daß wir sie zur quantitativen Deutung unserer besonders komplizierten Verhältnisse benutzen können.

Doch sei untersucht, ob wir die stärkere Wirkung von US und Wärme auf die Verdünnung 1 : 10 des Komplements durch einen wirksamen Stoßmechanismus erklären können. Allein durch den Vorgang der Verdünnung nehmen die Sulfhydrilgruppen zu, woraus man schließen kann, daß mit steigender Verdünnung eine teilweise Depolymerisation des Eiweißes eintrat. Andererseits nimmt die Zahl der Zusammenstöße der Makromoleküle untereinander mit zunehmender Verdünnung ab. Vielleicht besteht folgende Möglichkeit zur Erklärung der stärkeren Wirkung von US und Wärme bei Verdünnung der Lösung: Bei konzentriertem Komplement erfolgen die Zusammenstöße zwar häufig, die Moleküle bleiben aber infolge der geringen Depolymerisationsneigung unversehrt; bei hohen Verdünnungen nehmen die Bindungskräfte zwar infolge der steigenden Depolymerisationsneigung ab, die Zahl der wirksamen Zusammenstöße ist aber seltener. Dazwischen liegt das Wirkungsoptimum, bei dem gerade die Depolymerisationsneigung so groß ist, daß beim Zusammenstoß der Moleküle diese zerschlagen werden und die Zahl der Zusammenstöße noch häufig genug ist, damit eine deutliche Wirkung zustande kommt.

Auf Grund der Annahme von wirksamen Zusammenstößen der Moleküle können wir erklären, warum sich US und Wärme in ihrer Wirkung nicht unterscheiden und warum sie sich verstärken. Auch ist damit geklärt, warum zur Zerstörung des Komplementes durch US eine bestimmte Vorerwärmung notwendig ist. Weiter folgt aus unserer Annahme, daß einmal dasselbe Komplement durch Lagern bei einer und derselben Temperatur etwas unter 0^0, wenn auch langsamer als bei höheren Temperaturen zerstört wird. Dagegen bleibt es in gefrorenem Zustand unverändert. Hier können die Zusammenstöße der Makromoleküle untereinander nicht mehr erfolgen, denn die Moleküle können im Kristallgitter nur noch um ihre Ruhelage hin- und herschwingen. Ebenso erklärt unsere Annahme des wirksamen Stoßmechanismus, warum der Phasenablauf der Denaturierung der Serum-

eiweißkörper durch US und Wärme nach Hinzufügen von anderen Makromolekülen, wie Periston und Agar-Agar, beschleunigt wird. Bei diesen Versuchen befinden sich mehr Makromoleküle in der Lösung, dementsprechend erfolgen Zusammenstöße häufiger. — Auch die Abhängigkeit der US-Wirkung von der Frequenz erklärt sich durch unseren Deutungsversuch.

G. Schmid nimmt an, daß die Makromoleküle nicht frei mit der Schallwelle mitschwingen. Er glaubt, daß sie durch intramolekulare Kräfte ein Netz bilden. Die an diesem Netz sich reibenden Moleküle des Lösungsmittels reißen die Moleküle auseinander. Wie er berechnet, ist für Polystyrol die Reibungskraft größenordnungsmäßig gleich der Bindungskraft zwischen 2 C Atomen. Ein Maximum der Wirkung bei einer bestimmten Verdünnung erklärt er dadurch, daß bei stärkeren Konzentrationen die intermolekularen Bindungen und Verhakungskräfte zusätzlich zu den chemischen Bindungen so stark sind, daß eine Zerreißung der Moleküle nicht mehr möglich ist. Dagegen fallen diese Kräfte bei stärker verdünnten Lösungen praktisch fort, und die Moleküle schwingen mit der vollen Amplitude mit. Dazwischen muß naturgemäß ein Optimum der zerstörenden Wirkung liegen. Voraussetzung sind also für seine Betrachtung die intermolekularen Kräfte, die stärker sein müssen als die chemischen Bindungskräfte, in unserem Falle als die S-S-Bindung. Als Hauptbeweis führt Schmid die Untersuchung von R. Signer an. Letzterer stellte fest, daß bei polydispersen Lösungen, d. h. Molekülen verschiedener Polymerisationsgrade, diese nicht unabhängig voneinander in der Ultrazentrifuge sedimentieren.

Nun können wir gerade diese Voraussetzung für unser Serum nicht gelten lassen, da hier bekanntlich alle Molekülgruppen je nach ihrem Schweregrad einzeln sedimentieren und sich so im Feld der Ultrazentrifuge besonders gut trennen lassen. Insbesondere besteht kein Anhalt, daß vorhandene intermolekulare Kräfte stärker sind als die chemischen Bindungen der Disulfidbrücken. Auch könnte diese Deutung nur mit Schwierigkeiten erklären, warum in unseren Versuchen US und Erwärmung ein so weitgehend ähnliches Resultat haben. Völlig ungeklärt bleibt aber, warum eine stärkere Spontanzerstörung bei nur geringerer Erwärmung bei konzentriertem Komplement liegt. Schmid müßte in unserem Falle das Gegenteil davon fordern. Auch kann man nicht verstehen, warum im flüssigen Zustand eine Änderung des Komplementes auftritt, im eingefrorenen dagegen nicht. Gegen diese Hypothese spricht auch, daß die Koagulationsphase durch die US-Einwirkung verstärkt und in ihrem Ablauf beschleunigt wird. Offenbar liegt bei Komplementmolekülen eine ganz andere Sachlage vor als es Schmid bei Polystyrol feststellte.

Zu überlegen bleibt, wieweit sich die aus der Serologie bekannten Tatsachen in die von uns entwickelte Anschauung fügen. Schon Morgenroth hat in Übereinstimmung mit unserer Beobachtung und Deutung darauf hingewiesen, daß Komplement in gefrorenem Zustand über lange Zeit konservierbar ist. Selbst die Temperatur der flüssigen Luft schädigt nach Lüdke und Petri nicht. Auch paßt zu unserer Vorstellung über den Zerstörungsmechanismus, daß Wehmeyer bei der Komplementinaktivierung die Gesetzmäßigkeiten einer monomolekularen Reaktion fand. Die einzige Tatsache, die unserer Anschauung zunächst zu widersprechen schien, wurde von Kiss veröffentlicht. Er glaubte, daß konzentriertes Komplement stärker durch Hitze inaktiviert wird als verdünntes. Bei Überprüfung seiner Versuchsreihen stellten wir aber fest, daß Kiss mit größeren Verdünnungen als 1 : 10 arbeitete, die auch bei uns weniger empfindlich gegenüber Hitze waren als das native Komplement.

Zusammenfassung.

An Meerschweinchenseren wurde die Veränderung der Komplementfunktion im Hämolyseversuch, die Viskosität und die Zahl der Sulfhydrilgruppen unter der Einwirkung von Ultraschall studiert. Die Befunde konnten durch die Annahme gedeutet werden, daß der Ultraschall die Zusammenstöße der Eiweißmoleküle in der Zeiteinheit vermehrt. Diese entwickelte Anschauung ließ alle Tatsachen unter einem Gesichtspunkt betrachten. Es wird angenommen, daß bei US die Eiweißkörper des Blutplasmas denaturieren. Gerichtete Schwingung der Moleküle verstärken sich in ihrer Wirkung. Die Eiweißdenaturierung durch US und Wärme verläuft in 2 Phasen. In der 1. werden die Makromoleküle durch Zusammenstöße untereinander zerschlagen, Disulfidbrücken dabei gespalten. Infolge der geringeren Größe der Bruchstücke nimmt die Viskosität ab. In der 2. Phase koagulieren die Teilchen, die Viskosität nimmt zu, die Sulfhydrilgruppen ab, da sie nicht mehr frei verfügbar sind. Nach Hinzufügen anderer Makromoleküle, wie Periston und Agar-Agar, tritt eine größere Zahl von wirksamen Zusammenstößen auf, der Phasenablauf wird beschleunigt. Für die US- und Wärmeeinwirkung auf verschiedene Komplementverdünnungen scheint ein Optimum bei der Verdünnung 1 : 10 vorzuliegen, einerseits mit steigender Verdünnung, vielleicht weil die Depolymerisationsneigung der Moleküle stärker wird, andererseits die Zahl von Zusammenstößen der Makromoleküle abnimmt. Bei niedrigen Temperaturen nimmt die Zahl der Zusammenstöße ab, dementsprechend tritt die stärkere Wirkung bei konzentriertem Komplement auf. In gefrorenem Zustand bleibt die Komplementzerstörung aus, da wirksame Zusammenstöße nicht mehr zustande kommen können. Die geschilderte Wirkung des US ist frequenzabhängig, sie nimmt mit fallender Frequenz ab.

Wir möchten an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. B. Rajewsky für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit und für Anregungen, sowie die kritische Durchsicht der Ergebnisse danken. Auch Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. Otto sprechen wir für die Förderung, die er uns zuteil werden ließ, unseren Dank aus.

Literatur.

Bergmann, L.: Der Ultraschall und seine Anwendung in Wissenschaft und Technik. — Brand, E.: Berl. klin. Wschr. **1907**, Nr 34. — Brandt, O.: Kolloid.-Z. **81**, 2 (1937). — Brandt, O., H. Freund u. E. Hiedemann: Verh. dtsch. phys. Ges., III. F. **18**, 28 (1937). — Z. Phys. **104**, 511 (1937). — Brohult, S.: Nature (Brit.) **140**, 805 (1937). — Brohult, S. and S. Claesson: Nature (Brit.) **144**, 111. — Bücks u. Müller: Z. Phys. **84**, 75 (1933). — Chambers and Earl W. Flosdorf: J. biol. Chem. (Am.) **114**, 75 (1936). — Friese, J. u. Waetzmann: Z. Phys. **29**, 110 (1924); **34**, 131 (1935). — Goldbaum, G. u. E. Waetzmann: Z. Phys. **54**, 179 (1929). — Hiedemann, E.: Grundlagen und Ergebnisse

der Ultraschallforschung. 1939. — Kiss, J.: Alexin und Antialexin. Jena 1921. — Biochem. Z. **29**, 487 (1922). — Kneser, H. C.: Ann. Phys., Lpz., V. F. **11**, 277, 777 (1938). — **16**, 337 (1933). — Z. techn. Phys. **15**, 559 (1934); **16**, 213 (1935). Kneser, H. O. u. Gauler: Phys. Z. **37**, 677 (1936). — Kneser u. Knudson: Ann. Phys., Lpz., V. F. **21**, 682 (1934). — Lüdke, H.: Jahresberichte über Ergebnisse der Immunitätsforschung 1909. Stuttgart 1910. — Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung, Erg.-Bd. I. Jena 1911. — McFarlane: Nature (Brit.) **142**, 1023 (1938). — Biochem. J. (Brit.) **29**, 407. — Morgenroth, J.: Berl. klin. Wschr. **19** 2, Nr 35. — Z. Immunit.forsch. **1904**. — Münch. med. Wschr. **1903**. — Morgenroth, J. u. Bieling: Biochem. Z. **68**, 85 (1915); **131**, 525, 541 (1922). — Morgenroth, J. u. Sachs: Berl. klin. Wschr. **1912**, Nr 27 u. 35. — Müller, H.: Phys. Z. **31**, 350 (1930). — Müller u. Kraefft: Z. Phys. **75**, 313 (1932). — Müller u. Waetzmann: Z. Phys. **62**, 167 (1930). — Pederson, O.: Die Ultrazentrifuge. Im Handbuch der Kolloidforschung, S. 244. 1940. — Nature (Brit.) **128**, 150. — Pohlmann, R. u. C. Wolpers: Kolloid-Z. **109**, 106 (1944). — Rajewsky, B.: Chemie und Physiologie des Eiweißes. 1938. — Strahlenther. **29**, 759 (1928); **33**, 363 (1929); **34**, 582 (1929). — Richardson, E. B.: Proc. roy. Soc., Lond. A **146**, 56 (1934). — Soc. Amer. **4**, 177 (1934). — Rondoni, P.: Chemie und Physiologie des Eiweißes, S. 26, 1938. — Sachs, H.: Handbuch der pathologischen Mikroorganismen, Bd. II/2, S. 779. — Schmid, G.: Phys. Z. **41**, 326 (1940). — Z. phys. Chem. (A) **186**, 113 (1940). — Schmid u. A. Roll: Z. Elektrochem. **45**, 769 (1939). — Seelich: Chemie und Physiologie des Eiweißes, S. 25 u. 98. 1938. — Signer: Helvet. chim. Acta **17**, 721 (1934). — Svedberg: Die Ultrazentrifuge. Im Handbuch der Kolloidforschung, S. 6. 1940. — Kolloid-Z. **85**, 119 (1938). — Svedberg u. Brohult: Nature (Brit.) **143**, 938 (1938). — Szaley, A.: Phys. Z. **35**, 293 (1934). — Z. phys. Chem., A **169** (1933). — Thieme, E.: Phys. Z. **39**, 384 (1938). — Tiselius: Biochem. J. (Brit.) **31**, 313, 1464. — Tuorila, Pauli: Kolloidchem. Beih. **24**, 1 (1927). — Tuorila u. Wiegener: Z. Pflanzenernährg, A **11**, 121 (1928). — Wehmeyer, P.: Z. Immunit.forsch. **100**, 1, 179.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
(Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Max Borst †).

Über die Verhütung des experimentellen Muskelfrühgifttodes durch Dicumarin*.

Von

H. Bayerle und R. Marx.

(Eingegangen am 30. Juni 1948.)

Schon Heidenhain[1] konnte 1891 über das eindrucksvolle Bild des sofortigen Todes von Versuchstieren berichten, die ganze frische Muskelextrakte oder Muskelpreßsäfte intravenös gespritzt erhalten hatten. Die Toxine dieser Preßsäfte wurden in neuerer Zeit genauer untersucht, da man hoffen durfte, für das Verständnis des traumatischen Kollapses daraus Erkenntnisse gewinnen zu können.

Lenggenhager[2] fand bei sofortiger Sektion der Versuchstiere nach der Injektion von Muskelextrakten massive Gerinnungen im rechten Herzen sowie den Lungenarterien und glaubte den Tod der Versuchstiere auf Vergiftung durch das Gerinnungsferment Thrombin, das er in den Extrakten vermutete, hervorgerufen. Er nannte die giftige Substanz des frischen Muskelextraktes in Analogie zum Frühgift des Blutes (Freund[3]) „Muskelfrühgift". Dyckerhoff, Schörcher und Torres[4] konnten dann die Aufklärung des toxischen Systems des frischen Muskelextraktes um einen wichtigen Schritt weiterführen. Es gelang ihnen nachzuweisen, daß es aus 2 Komponenten besteht, die sich in vivo in ihrer Wirksamkeit verstärken, und zwar aus einem Kollapsgift, von Dyckerhoff, Schörcher und Torres „Myotoxin" genannt, und Thrombokinase. Thrombin war in den Muskelextrakten in meßbaren Quanten nicht vorhanden. Die Aufklärung der Konstitution des Kollapsgiftes Myotoxin, das nach Schörcher[6] mit Adenosinphosphorsäure nicht identisch sein soll, ist bisher aus vorzüglich zeitbedingten Gründen nicht erfolgt. Dyckerhoff und Marx[7] studierten im Anschluß an diese Untersuchungen die Toxizität frisch defibrinierten Blutes, die schon H. Schmid[8] beschrieben hatte. Sie fanden, daß es sich aus 3 Faktoren zusammensetzt, einen aus dem Thrombozytenzerfall herrührenden Toxin, aktiven Thrombin und Thrombokinase. Marx und Dyckerhoff[9] fanden ein ähnlich kombiniertes Giftsystem im Extrakt länger stehenden Lungenbreies, bestehend aus einem kollapserzeugenden Eiweißprodukt, wahrscheinlich von Amincharakter und aktiver Gewebsthrombokinase.

Jedenfalls kann als sicher gelten, daß die hohe Toxizität von frischem Muskelextrakt, frisch defibriniertem Blut und Extrakten lang gelagerter Gewebe in prinzipiell ähnlicher Weise durch eine

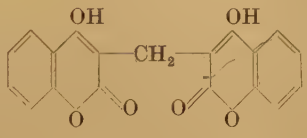
* Die Arbeit war 1944 in der Z. exper. Med. in Druck gelegt worden. Nachdem diese Zeitschrift noch nicht wieder erscheint, kommt sie mit geringen Änderungen im vorliegenden Archiv zum Abdruck.

Kombination von Kollapstoxinen mit aktiven Gerinnungsfermenten hervorgerufen wird. Relativ hohe Dosen Gewebsthrombokinase allein langsam injiziert, erweisen sich intravenös beim Kaninchen als praktisch nie tödlich. Allerdings lassen sich bei sorgfältiger Sektion dieser Versuchstiere fast immer kleine und kleinste Embolien in den Lungen nachweisen [10].

Durch blutgerinnungshemmende Substanzen gelang es nun schon früher, den Tod der Versuchstiere nach der Injektion frischer Muskelextrakte zu verhüten.

Verschiedene Verbindungen, solche, welche intravasal die Entstehung des aktiven Thrombins aus Prothrombin hemmen (Antiprothrombine und Antithrombokinasen) und auch solche, die zusätzlich oder allein die Wirkung aktiven Thrombins hemmen (Antithrombine), vermögen intravasal (nach parenteraler Injektion) sofort den Tod der Versuchstiere durch frische, intravenös injizierte Muskelextrakte zu verhüten. Novirudin, Hirudin, Liquoid, Germanin, Heparin und Neodym [11] zeigten sich prophylaktisch injiziert als wirksam. Die längste prophylaktische Wirkung kam bisher dem Neodymazetat zu, das schon in Dosen, welche die Gerinnungszeit von Oxalatplasma nach Dyckerhoff, Goossens und Schwantke nicht meßbar verlängerten, den Muskelfrühgifttod beim Versuchstier verhindern kann.

Es erschien uns nun wichtig zu untersuchen, ob die von der Mayo-Klinik in Amerika [12] 1941 in die Therapie der Thrombosen eingeführte Substanz Dicumarin (3, 3′-methylen-di-(4-oxycumarin),



welche die Bildung des Euglobulins Prothrombin in der Leber stört und dadurch Hypoprothrombinämien beliebigen Ausmaßes zu setzen gestattet [13], den Muskelfrühgifttod von Versuchstieren verhindern könnte. Es ergab sich mit dieser Versuchsanordnung die Möglichkeit, verhältnismäßig schnell und einfach zu prüfen, ob diese Substanz das Blutgerinnungssystem nach Eintritt ihrer Wirkung (welche nach der Veränderung des Prothrombins beurteilt, erst nach einer mehrstündigen — 1- bis 2tägigen) Latenzzeit auftritt [14], im Sinne stark verminderter intravasaler Thrombosetendenz verändere.

Außerdem wollten wir feststellen, ob es gelänge, durch eine starke prophylaktische Gabe eines zentral angreifenden Analeptikums, des Cardiazols, die Komponente des Muskelfrühgiftsystems, das Myotoxin, zu paralysieren.

Angewandte Methoden:

1. Prothrombinbestimmung nach A. Quick [15]. Zit. nach R. Marx [16].
2. Prothrombinpotentialbestimmung nach O. Thordarson [17]. Zit. nach R. Marx [18].

3. Plasmagerinnungszeit nach Dyckerhoff, Goossens und Schwantke[19]. Die Injektionen erfolgten intravenös in die Ohrrandvenen der Kaninchen. Alle Gerinnungsbestimmungen wurden bei 37° C im Thermostaten durchgeführt.

Verwendete Substanzen:

1. Dicumarin (3', 3-methylen-di-(4-oxycumarin) — Firma Boehringer u. Soehne, Mannheim.

10 mg Dicumarin wurden in 1 cm³ n/10-Natronlauge gelöst und sodann mit etwas Essigsäure bis zu einem Punkt neutralisiert, bei dem Dicumarin gerade noch in Lösung bleibt. Eine solche Lösung kann Kaninchen symptomlos intravenös verabreicht werden.

2. Muskelfrischextrakt. Muskel eines durch Nackenschlag getöteten Kaninchens wurde sofort nach Eintritt des Todes herausgeschnitten und durch eine Fleischmaschine gedreht. Der Muskelbrei wurde 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und durch ein Faltenfilter filtriert. Der Extrakt muß innerhalb 30 Min. vom Tode des Tieres ab dem Testtier intravenös injiziert werden. 5 cm³ dieses Extraktes sind für ein Kaninchen von 3 kg Gewicht in dieser Zeit sicher tödlich. Bei längerem Stehen wird der Extrakt in bezug auf Letalwirkung bei intravenöser Injektion unwirksam.

3. Cardiazol, pro injectione.

4. Humanhirnthrombokinase, konserviert nach Dam und Glavind[20].

Versuch I. Zwei Kaninchen von je 3 kg Gewicht erhielten je 10 mg/kg Dicumarin intravenös injiziert. Nach 48 Stunden betrugen die Oxalatplasmagerinnungszeiten der beiden Tiere nach der Methode von Dyckerhoff, Goossens, Schwantke bestimmt, 11 Min., 25 Sek. und 19 Min. (gegenüber einer physiologischen Schwankungsbreite von 90 — 330 Sek.).

Die entsprechenden Prothrombinzeiten betrugen in den 4 verwendeten Plasmaverdünnungsstufen (100, 50, 25 und 10%) 62, 73, 80, 109 Sek. und 56, 57, 116, 157 Sek. gegenüber normalen Kaninchen mit den Mittelwerten 17, 18, 23 und 27 Sek. Die beiden Tiere mit den verlängerten Plasmagerinnungszeiten und Prothrombinzeitwerten überlebten die Injektion von je 5 cm³ Frischmuskelextrakt, während ein nicht mit Dicumarol vorbehandeltes Normalkaninchen innerhalb einer Minute in charakteristischer Weise zugrunde ging. Bei der sofortigen Sektion dieses Tieres fanden sich wie stets Thromben im rechten Herzen und massive Embolien in den Lungenarterien. Die beiden dicumarinisierten Kaninchen ließen überhaupt keine krankhaften Symptome erkennen und vertrugen darüber hinaus sogar eine anschließende 2. Injektion von 5 cm³ des toxischen Frischmuskelextraktes intravenös symptomlos.

Versuch II. Einem Kaninchen von 3,2 kg Körpergewicht wurden 20 mg/kg Dicumarin intravenös injiziert. 10 Min. darauf wurden die Plasmagerinnungszeit und die Prothrombinzeit bestimmt. Sie waren innerhalb der beobachteten physiologischen Schwankungsbreite gelegen. Diesem Tier wurden nun 5 cm³ Frischmuskelextrakt (15 Min. alt vom Tod des muskelspendenden Tieres aus gerechnet) intravenös

injiziert. Es starb in genau derselben Weise wie ein unbehandeltes Normalkaninchen. Bei der Sektion fanden sich die charakteristischen Thromben in Herz und Lunge.

Versuch III. Ein Kaninchen von 2,9 kg Gewicht erhielt 3 mg/kg Dicumarin intravenös. Nach 24 Stunden betrug die Plasmagerinnungszeit 6 Min. 10 Sek. und die Prothrombinzeitwerte der 4 Verdünnungsstufen 33, 34, 38 und 40 Sek. Das Prothrombinpotential nach THORDARSON betrug 51% der Norm. Diesem Tier wurde sofort nach der Bestimmung der Gerinnungszeitwerte 5 cm³ Frischmuskelextrakt injiziert, welche es in typischer Weise töteten.

Versuch IV. Ein Kaninchen von 2,8 kg Körpergewicht erhielt 0,5 cm³ Cardiazol intravenös. Es trat ein leichter Cardiazolkrampf, insbesondere der Kaumuskulatur ein, der im Verlauf weniger Minuten abklang. Anschließend war die Atmung stark vertieft und beschleunigt. 10 Min. nach der Cardiazolinjektion erhielt das Tier 5 cm³ Frischmuskelextrakt intravenös. Es erfolgte der Exitus genau wie beim unbehandelten Tier mit dem gleichen beschriebenen typischen Sektionsbefund der Thrombose mit Embolien.

Diskussion.

Aus den Versuchen geht hervor, daß die Voraussetzung für die Verhütung des Muskelfrühgifttodes durch Dicumarin eine sehr starke Verminderung des Prothrombins ist. Mäßige Verminderungen des Prothrombins bis etwa 50% der Norm genügen nicht, selbst dann, wenn die Plasmagerinnungszeit nach DYCKERHOFF, GOOSSENS, SCHWANTKE schon etwas über die obere Grenze der physiologischen Schwankungsbreite hinaus verlängert ist. Dies ist eine wichtige Stütze für die von R. MARX an anderer Stelle[21] weiter ausgeführte Meinung, daß man vom Gesichtspunkt der Korrelationsverschiebung der Einzelfaktoren des Blutgerinnungssystems aus am besten die Wirkungen der Alterationen einzelner Gerinnungskomponenten auf das Thrombosegeschehen verstehen kann. Durch die Verminderung des Prothrombins im Plasma erhöht sich automatisch die Menge der je Prothrombineinheit vorhandenen Wirkeinheiten Antithrombin bzw. Antiprothrombin, d. h. es kommt zu einer relativen Antiprothrombinämie bzw. Antithrombinämie, also jedenfalls funktionell bezüglich der Thrombosevorgänge in den Gefäßen zu etwas Ähnlichem wie bei der Injektion von Heparin oder Neodymazetat.

Aus dem Versuch III geht hervor, daß das Dicumarin keine Sofortwirkung hat wie etwa Heparin oder Neodymazetat, sondern daß es erst wirksam werden kann, wenn es durch Blockierung der Prothrombinbildung in der Leber eine relative Antithrombinämie erzeugt hat. Zwar kommt dem Dicumarin eine geringfügige Hemmung der Thrombokinase

zu [22], doch ist diese im Verhältnis viel zu gering, um in diesem Zusammenhang entscheidend wirksam zu werden.

Da Dicumarol peroral ebenso wirksam ist wie parenteral — (bei unseren Versuchen wurde nur aus Gründen der exakteren Dosierung des Dicumarols der intravenöse Verabreichungsmodus gewählt), — kann aus unseren Versuchen geschlossen werden, daß auch mit peroraler Dicumarinverabreichung der Muskelfrühgifttod zu verhüten sein wird, wenn nur der Prothrombinspiegel tief genug sinkt.

Daß Cardiazol nicht in der Lage ist, die Myotoxinkomponente des Muskelfrühgiftes unwirksam zu machen, zeigt Versuch IV. Es steht noch nicht sicher fest, auf welche Weise der Tod der Versuchstiere durch gereinigtes, nach Dyckerhoff und Mitarbeitern hergestelltes Myotoxin zustandekommt. Wegen der Bedeutung dieses Stoffes für die Genese der traumatischen Kollapse dürfte es wichtig sein, die experimentelle Klärung des genauen Wirkungsmechanismus des gereinigten, thrombokinasefreien Myotoxins im Organismus in Angriff zu nehmen. Nur auf diese Weise erscheint es aussichtsvoll, ein sicheres Antidot gegen diese Komponente des Muskelfrühgiftes zu finden.

Unsere Untersuchungen stützen die Auffassung, daß nur starke Senkungen des Prothrombinspiegels in der Lage sind, die intravasale Thrombosetendenz wirksam zu verhindern. Für die praktische Behandlung des traumatischen Kollapses dürfte Dicumarin nicht in Betracht kommen, da es keine Sofortwirkung hat. Bei starken Gewebszerreißungen dürfte es sich auch verbieten, die Blutstillungsfaktoren zu stark zu schwächen. Man wird nur solche Mittel anwenden, welche im Blutungsfall wieder sofort ausgeschaltet werden können. Praktisch ist dies bisher nur beim gereinigten Heparin der Fall (z. B. Liquemin Hoffmann-la Roche und Thrombovetren Promonta, Hamburg). Heparin kann im Notfall durch intravenöse Injektion von Protamin sofort wieder ausgeschaltet werden [23].

Zusammenfassung.

1. Durch prophylaktische Gaben von Dicumarin kann über eine starke Senkung des Prothrombinspiegels der experimentelle Muskelfrühgifttod verhütet werden.

2. Der Wirkungsmechanismus kann am besten durch die je Prothrombineinheit des Blutes unter der Wirkung von Dicumarin relativ stark gesteigerte Antiprothrombin- und Antithrombinaktivität des Blutes erklärt werden.

3. Durch prophylaktische Cardiazolinjektion kann der Muskelfrühgifttod nicht verhütet werden.

4. Die Aufklärung der chemischen Natur und der genauen Wirkung des gereinigten Myotoxins und die Auffindung eines Antidots gegen das

Myotoxin erscheint wichtig, um die Möglichkeiten bewußt kausaler Therapie beim traumatischen Schock zu verbessern.

Literatur.

[1] Heidenhain, G.: Pflügers Arch. **49**, 209 (1891). — [2] Lenggenhager: Mitt. Grenzgeb. Med. u. Chir. **44**, 175 (1935/37). — [3] Freund, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **86**; 88 (1920). — [4] Dyckerhoff, H., F. Schörcher u. J. Torres: Biochem. Z. **300**, 198 (1939). — Dyckerhoff, H. u. F. Schörcher: Biochem. Z. **300**, 193 (1939). — [5] Dyckerhoff, H.: Beitr. path. Anat. **103**, 245 (1939). — Dyckerhoff, H., F. Schörcher u. J. Torres: Biochem. Z. **300**, 198 (1939). — [6] Schörcher, F.: Dtsch. Z. Chir. **234**, 225 (1934). — [7] Dyckerhoff, H. u. R. Marx: Z. exper. Med. **108**, 363 (1940). — [8] Schmid, H.: In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 8, S. 1113. 1928. — [9] Marx, R. u. H. Dyckerhoff: Biochem. Z. **316**, 1 (1943). — [10] Marx, R. u. H. Dyckerhoff: Biochem. Z. **316**, 1 (1943). — [11] Dyckerhoff, H. u. K. Loevenich: Z. exper. Med. **106**, 98 (1939). — [12] Butt, H. R., E. V. Allen and J. L. Bollann: Proc. Staff Meet. Mayo Clin., Rochester **16**, 388 (1941). — Bingham, J. B., O. O. Meyer and F. L. Bollmann: Amer. J. med. Sci. **202**, 563 (1941). — [13] Bayerle, H. u. R. Marx: Biochem. Z. **319**, 18 (1948). — [14] Bayerle, H. u. R. Marx: Biochem. Z. **319**, 18 (1948). — [15] Quick, A.: J. biol. Chem. (Am.) **109**, 73 (1935). — [16] Marx, R.: Z. exper. Med. **114**, 18 (1944). — [17] Thordarson, O.: Diss. Aarhus 1941. — [18] Marx, R.: Z. exper. Med. **114**, 18 (1944). — [19] Dyckerhoff, H., N. Goossens u. J. Schwantke: Z. exper. Med. **105**, 145 (1939). — [20] Dam, H. u. Glavind: Acta med. scand. (Schwd.) **96**, 108 (1938). — [21] Marx, R.: Z. ärztl. Forsch. **II**, 413 (1948). — [22] Dyckerhoff, H.: Biochem. Z. **316**, 397 (1944). — [23] Jorpes, E., P. Edmann and T. Tanning: Lancet **1939**, 675.

Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität München (Direktor des Institutes: i. V. Dozent Dr. med. L. Burckhardt).

Über ein Komplement und Prothrombin mit besonderer Berücksichtigung der Antithrombotika 3,3′-methylen-di-(4-oxycumarin) und Heparin.

Von

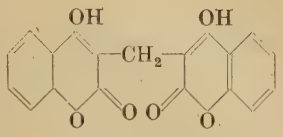
R. Marx, H. Bayerle und I. Skibbe.

(Eingegangen am 30. Juni 1948.)

Nachdem die Substanz Dicumarol [3,3′-methylen-di-(4-oxycumarin)] infolge ihrer spezifisch die Prothrombinbildung in der Leber hemmenden Wirkung[1] als wertvolles Arzneimittel zur Prophylaxe und Therapie der Thrombosekrankheiten erkannt worden ist [2], wurde die genauere Erforschung ihrer eventuellen weiteren Effekte im Organismus von ärztlichem Interesse. In dieser Hinsicht schien uns die Beobachtung von W. Pfannenstiel [3], daß es unter der Wirkung von Dicumarol gleichzeitig mit dem Absinken des Prothrombinspiegels zu einer Erniedrigung des Komplementspiegels des Blutes komme, von Bedeutung. Denn das Komplement kann nach R. Doerr [4] als der wichtigste Faktor der humoralen Abwehr bezeichnet werden und ist darüber hinaus für den Ablauf von Antigen-Antikörperreaktionen von Wichtigkeit. Wir stellten uns daher die Aufgabe, das Verhalten des Komplementes nach Dicumarolverabreichung im Tierversuch näher zu studieren und zugleich die Frage nach dem stofflichen Zusammenhang zwischen dem Prothrombin und den Faktoren des Komplementes genauer zu untersuchen, da in der Beobachtung von Pfannenstiel ein neuer Hinweis auf das Bestehen von Beziehungen zwischen Komplement und Prothrombin gegeben schien. Von dieser Fragestellung ausgehend interessierte uns des weiteren, ob die ebenfalls als Antithromboticum bewährte Substanz Heparin [5] eine komplementhemmende Wirkung habe und ob ihre bei genügender Dosierung den anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens verhütende Wirkung eventuell ganz oder teilweise mit einer Hemmung der Komplementaktivität erklärt werden könne, mit anderen Worten: es ergab sich das allgemeinere Problem, ob allergische Symptomenkomplexe durch komplementblockierende Substanzen bzw. Substanzen von der Wirkungsart des Heparins abgeschwächt oder verhütet werden könnten.

Verwendete Substanzen.

1. Dicumarol [3,3'-methylen-di-(4-oxycumarin)] (s. nebenstehende Formel) — (Firma Hoffmann-la Roche, Basel).



2. Heparin (Präparat Liquemin — Firma Hoffmann-la Roche, Basel).

3. Mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Menschen- und Meerschweinchenerythrozyten aus Zitratblut.

4. Präpariertes Kaninchen-Immunplasma (30 Min. auf 56° C erwärmt und abzentrifugiert).

5. Menschenzitratplasma, Kaninchen- und Meerschweinchenoxalatplasmen nach Quick [6].

6. Humanhirnthrombokinase, konserviert nach Dam und Glavind [7].

7. Ammonsulfatfibrinogen vom Rind nach Thordarson [8].

8. $Al(OH)_3$.

9. $Ca_3(PO_4)_2$.

10. $Mg(OH)_2$.

Angewandte Methoden.

1. Gewinnung eines Hämolysin-Immunplasmas beim Kaninchen:

Gesunden Meerschweinchen wurde durch Punctio cordis 5 cm³ Oxalatblut entnommen. Die Blutkörperchen wurden durch Zentrifugieren vom Plasma getrennt und darauf 3mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und der Rückstand des letzten Zentrifugats in 10 cm³ physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Jeweils 2 cm³ dieser Aufschwemmung wurden im Abstand von 2 Tagen Kaninchen in die Ohrvene injiziert, bis ein genügend hoher Hämolysintiter festgestellt werden konnte. Dies war gewöhnlich nach 5 Injektionen der Fall.

2. Auswertung des Komplementgehaltes von Plasmen:

Das hämolytische System bestand aus gewaschenen Meerschweinchen- bzw. Menschenerythrozyten, aus nach 1. gewonnenem Kaninchenhämolysinplasma, das zur Vernichtung seines Eigenkomplementes 30 Min. auf 56° C erwärmt worden war (das ausfallende Fibrinogen wurde abzentrifugiert) und jeweils verschiedene Verdünnungen der auf Komplementgehalt zu testenden Plasmen.

Beobachtet wurde die Zeit der auftretenden Hämolyse in diesem System unter genormten Bedingungen. Verglichen wurde jeweils die Geschwindigkeit des Auftretens der Hämolyse bei Zugabe bestimmter Dosen verschiedener normaler Plasmen als Komplement im Vergleich zu derjenigen des zu untersuchenden fraglichen Plasmas. Es wurden jeweils 0,1 cm³ Meerschweinchenerythrozytenaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung (Erythrozyten nach dem Prinzip 1 hergestellt), 0,3 cm³ Kaninchenimmunplasma und von 0,01—0,5 cm³ Komplementplasma zusammengegeben und auf das Gesamtvolumen von 3 cm³ mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Die Ansätze erfolgten in gewöhnlichen Reagensgläsern, die Ablesung bei 20° C.

3. Sensibilisierung der Meerschweinchen für den Schock:

Menschenzitratplasma wurde 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und davon jeweils 0,5 cm³ den Meerschweinchen 3mal in einer Woche subkutan appliziert. Nach 3 Wochen wurden die Tiere durch intrakardiale Injektion von 0,1 cm³ menschlichen Serums in anaphylaktischen Schock versetzt.

4. Applikation von Dicumarol:

Die Verabreichung von 3,3-methylen-di-(4-oxycumarin) geschah intravenös beim Kaninchen in einer Lösung von 15 mg in 1 cm³ n/10-NaOH. Vor der Injektion wurde die Alkalität der Lösung durch vorsichtige Zugabe von Essigsäure

stark abgeschwächt. Die Kaninchen erhielten 30 mg/kg Körpergewicht intravenös, die Meerschweinchen 50 mg/kg subkutan. Die Blutentnahme zur Komplementbestimmung erfolgte frühestens am 2. Tage nach Verabreichung von Dicumarol unter Kontrolle der Dicumarolwirkung am Prothrombinspiegel.

5. Prothrombinbestimmung modifiziert nach Quick[9], zit. nach R. Marx[10].

6. Feststellung des Prothrombingehaltes in adsorbierten Plasmen:

Je 1 cm³ der adsorbierten Plasmen wurden mit je 1 cm³ 1:10 verdünnter Menschenhirnthrombokinase nach Dam und Glavind und 1 cm³ Fibrinogenlösung und 1 cm³ $CaCl_2$-Lösung nach Quick[11] versetzt und hierauf die Mischung unter Zugabe von Toluol zugekorkt 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Durch Schütteln wurde das Auftreten von Gerinnung beurteilt. Parallel wurde die Prothrombinfreiheit der für diesen Versuch verwendeten Fibrinogenlösung sichergestellt, da ein geringer Prothrombingehalt dieser Fibrinogenlösung zu Irrtümern über den Ausschüttelungseffekt in den Plasmen Anlaß geben könnte.

Die Zugabe von Fibrinogen zu ausgeschüttelten Plasmen zur Prüfung auf Prothrombingehalt ist wichtig, weil durch die verwendeten Adsorptionsmittel auch eine Verminderung des Fibrinogengehaltes der Plasmen bewirkt wird.

Die Ergebnisse finden sich auf den folgenden Tabellen verzeichnet.

Tabelle 1. *Dicumarolwirkung auf Komplement- und Prothrombintiter von Kaninchen.*

	Hämolysezeit in Minuten und Sekunden bei verwendeter Dosis Komplementplasma in cm³					Tier-Nr.	Prothrombinzeit mit cm³ Plasma in Sekunden			
		0,5	0,1	0,05	0,03	0,02		1	0,5	0,25	0,1
1. Tiere vor Behandlung mit Dicumarol							1	8	10	13	25
							2	9	11	13	26
2a. Tiere am ersten Tage nach Dicumarol-Behandlung (45 mg/kg)		6	12	30	42	—	1	23	28	37	44
		5	8	15	—	—	2	21	21	27	29
2b. Normale Tiere		2	6	18	—	—	a				
		0^{45}	—	25	40		b	8	10	11	20
		3	7	27	—	—	c	8	10	12	23
3a. Tiere am zweiten Tage nach Dicumarol-Behandlung	3	5	10	9	11	14	1	43	82	126	324
	3	4	4^{30}	5	7	13	2	35	45	85	180
3b. Normale Tiere im Vergleich	3	4	4^{30}	6	10	12	a	10	10	11	16
	4	5	5^{30}	6	8	—	b	9	11	11	20
	3	3^{15}	4	5	7	15	c	9	11	14	28
	3	4	4^{15}	5	9	—	d	11	11	12	25
4a. Tiere am ersten Tage nach Dicumarol-Behandlung (30 mg/kg)	5	5^{30}	6^{30}	9	15	24	3	23	25	31	59
	5	6	7	8	14^{30}	26	4	24	27	35	57
4b. Normale Tiere im Vergleich	5^{30}	6	7	10	18	40	a	12	14	17	27
	5	6	7	10	15	30	b				
	6	7	9	10	15	28	c	10	13	18	31
5a. Tiere am 8. Tag nach Dicumarol-Behandlung (30 mg/kg)	4^{30}	5^{15}	5^{30}	7^{15}	9^{30}	15	3	48	51	60	196
	4^{00}	4^{30}	5^{15}	6^{30}	9^{00}	16	4	52	67	104	207

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

	Hämolysezeit in Minuten und Sekunden bei verwendeter Dosis Komplementplasma in cm³						Tier-Nr.	Prothrombinzeit mit cm³ Plasma in Sekunden			
	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05		1	0,5	0,25	0,1
5b. Normale Tiere im Vergleich	5	5^{30}	6^{30}	8	12	21	a	13	11	18	29
	4^{45}	5^{15}	6	8	10	16	b	10	12	14	20
	4^{30}	5	5^{30}	7^{30}	10	14^{30}	c	12	14	17	26
6. Kaninchen 5 am 4. Tag nach erster, am 1. Tag nach neuer Dicumarolgabe (30 mg/kg)	4^{30}	5	5^{15}	6	8	14	5	151	189	198	685
7. Kaninchen 6 am 4. Tag nach Dicumarolgabe (30 mg/kg)	4	5	5^{30}	6	9	16	6	152	202	332	760
8. Kaninchen am 3. Tag nach Dicumarol-Behandlung (30 mg/kg)	3^{15}	4^{20}	4^{55}	5^{25}	8^{20}	14	7	60	74	105	207
9. Normale Kaninchen im Vergleich	2^{30}	2^{50}	3^{15}	4^{05}	8^{45}	8^{45}	a	12	18	15	23
	2^{10}	2^{30}	3^{20}	4	6^{50}	9	b	12	13	16	28
	2^{20}	2^{50}	3^{30}	6	9	18	c	13	15	22	35
10. Kaninchen 5 am 8. Tag nach erster, am 4. Tag nach zweiter Dicumarolgabe (30 mg/kg)	1^{15}	2^{20}	2^{45}	3^{10}	4^{50}	6	5	45	56	89	229
11. Kaninchen 6 am 8. Tag nach erster Dicumarolgabe (30 mg/kg)	2^{30}	3^{05}	3^{30}	5	7	10^{20}	6	50	70	105	225
12. Normale Kaninchen im Vergleich	2^{10}	3^{10}	3^{35}	4^{50}	6^{40}	9^{20}	a	11	13	14	21
	1^{55}	2^{20}	2^{55}	3^{40}	5	6^{40}	b	12	13	15	22

Aus der Tabelle 1 kann ersehen werden, daß nur bei einem Teil der Kaninchen, die mit hohen Dosen Dicumarol behandelt worden waren, eine gewisse, nicht bei allen Tieren deutliche Abschwächung der Komplementaktivität sich findet. Eine Parallelität zwischen der Prothrombinzeitverlängerung bzw. der Verminderung des Prothrombins und der Komplementaktivität der Plasmen besteht keinesfalls. Es ist zu berücksichtigen, daß viele der untersuchten Plasmen einen Prothrombinindex unter 5% der Norm hatten.

Tabelle 2 zeigt, daß nur bei einem Teil der mit Dicumarol behandelten Meerschweinchen eine geringe Verminderung der Plasmakomplementaktivität festgestellt werden kann. Parallelität zwischen Prothrombinzeitverlängerung und Komplementaktivität läßt sich dabei nicht feststellen.

Tabelle 2. *Dicumarolwirkung auf Komplement- und Prothrombintiter von Meerschweinchen.*

	Hämolysezeit in Minuten und Sekunden bei verwendeter Dosis Plasmakomplement in cm³				Tier-Nr.	Prothrombinzeit mit 0,3 cm³ Plasma in Sekunden
	0,3	0,2	0,1	0,05		
1. Normale Tiere	2^{15}	3^{00}	4^{54}	6^{30}	I	30
	3^{15}	4^{00}	5^{15}	9^{15}	II	41
	3^{00}	3^{30}	4^{35}	6^{20}	III	35
	2^{45}	3^{25}	4^{54}	7^{15}	IV	35
	3^{15}	4^{00}	5^{30}	8^{15}	V	41
	3^{10}	4^{05}	5^{15}	7^{50}	VI	36
2. Dicumarol-behandelte Tiere	3^{25}	3^{50}	6^{30}	8^{45}	I	73
	3^{00}	3^{30}	5^{00}	7^{15}	II	194
	3^{30}	4^{30}	6^{15}	12^{00}	III	185
	3^{15}	3^{45}	6^{30}	9^{45}	IV	165
	3^{00}	3^{40}	5^{30}	9^{25}	V	105
	3^{10}	4^{15}	7^{00}	10^{00}	VI	180
	3^{35}	3^{55}	5^{40}	9^{15}	VII	350
	3^{25}	3^{45}	5^{15}	9^{15}	VIII	150
	3^{40}	4^{00}	6^{30}	10^{00}	IX	170
	3^{35}	4^{20}	6^{30}	—	X	145

Tabelle 3. *Ergebnisse der selektiven Adsorption bei verschiedenen Plasmen in bezug auf Prothrombin und Komplement.*

Adsorptionsmittel	Verwandte Menge mg/cm³	Art des Plasmas	Adsorptionsergebnis in bezug auf		Ausschüttelungszeit in Minuten
			Prothrombin	Komplement	
$Al(OH)_3$	27	Kaninchen I	ø	+	3 × 10
,,	27	,, II	(+)	ø	3 × 10
,,	27	,, III	+	ø	3 × 10
,,	34	,, IV	+	ø	3 × 10
,,	34	,, IV	+	ø	3 × 10
,,	34	,, IV	+	ø	3 × 10
,,	34	,, V	+	ø	3 × 10
,,	34	,, V	+	ø	3 × 10
,,	34	,, V	+	ø	3 × 10
,,	27	Mensch	ø	ø	2 × 10
,,	33	Rind I	ø	ø	2 × 10
,,	33	,, II	+	ø	2 × 10
$Ca_3(PO_4)_2$	80	Kaninchen I	+	+	2 × 10
,,	80	,, II	+	+	3 × 10
,,	80	,, III	+	+	3 × 20
,,	80	,, IV	+	+	3 × 20
,,	80	,, IV	+	+	3 × 20
,,	80	,, IV	+	+	3 × 20
,,	80	,, V	(+)	+	3 × 20
,,	80	Mensch	ø	+	3 × 20
,,	100	Rind I	ø	ø —	3 × 20
,,	100	,, II	(+)	+	3 × 20
$Mg(OH)_2$	100	Kaninchen I	ø	(+)	3 × 10
,,	100	,, II	ø	(+)	3 × 10

Aus Tabelle 3 kann entnommen werden, daß das Adsorptionsergebnis in den Plasmen bei sonst gleichen Bedingungen von der Herkunft und der Individualität der Plasmen abhängig ist.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß die Empfindlichkeit des Komplements in den Plasmen verschiedener Spezies gegenüber Heparin sich bei allen untersuchten Spezies nachweisen läßt. Im ganzen ist aber das Heparin als Komplementinhibitor wesentlich schwächer wirksam denn als Inhibitor der Blutgerinnung. H. Dyckerhoff und R. Marx [12] hatten an anderer Stelle gezeigt, daß sich im Rinder-Mg-Sulfatplasmatest noch $^1/_{10}\,\gamma$ Heparin nachweisen lassen.

Tabelle 4. *Komplementhemmung in vitro durch Heparin (Liquemin).*

Spezies	Heparinzusatz in mg/cm³ Oxalatplasma	Hämolysezeit in Minuten im Komplement. Bestimmung. Ansatz (3 cm³ Ges.-Vol.) mit 0,1 cm³ Plasma
Rind	0	7^{10}
	4	15^{25}
	10	24^{10}
	20	42^{30}
Kaninchen	0	4^{40}
	4	11^{10}
	10	24^{00}
	20	40^{00}
Meerschweinchen	0	12
	4	75
	10	> 100
	20	—
Mensch	0	2^{30}
	4	5^{30}
	10	8^{40}
	20	17^{00}

Tabelle 5. *Komplementspiegel und Prothrombinzeitindex normaler Meerschweinchen im Vergleich zu solchen auf dem Höhepunkt des anaphylaktischen Schocks mit und ohne Dicumarolbehandlung.*

	Hämolysezeit in Minuten und Sekunden bei verwendeter Dosis Komplementplasma in cm³			Tier Nr.	Prothrombinzeitindex
	0,3	0,2	0,1		
1. Normale Tiere	4^{50}	5^{40}	16^{20}	1	
	5^{30}	6^{10}	12^{30}	2	106
	5^{30}	7^{30}	17^{00}	3	106
	5^{00}	14^{00}	—	4	123
	4^{30}	7^{30}	28^{00}	5	100
2. Anaphylaktische Schocktiere	6^{30}	8^{55}	—	1	96
	20^{00}	32^{00}	> 40	2	84
	9^{00}	12^{00}	32	3	60
	7^{30}	12^{00}	—	4	94
	7^{30}	8^{00}	—	5	57
3. Anaphylaktische Schocktiere mit Dicumarolbehandlung	5^{30}	6^{15}	—	1	18
	5^{50}	10^{30}	—	2	17
	7	7^{00}	23^{00}	3	17
	5^{00}	7^{00}	16^{00}	4	18
	6^{10}	8^{00}	—	5	15

Aus den Zahlen der Tabelle 5 kann ersehen werden, daß der Komplementgehalt der Meerschweinchen im anaphylaktischen Schock durchschnittlich unter der Norm liegt. Weniger deutlich war dies in den von uns untersuchten Fällen bei den Meerschweinchen, welche 3 Tage bevor sie in den anaphylaktischen Schock versetzt wurden, 50 mg/kg Dicumarol subkutan erhalten hatten. Wir hatten den Eindruck, daß entgegen unserer Erwartung die Wirkung von Dicumarol und die Wirkung des anaphylaktischen Schocks sich in bezug auf die Komplementaktivitätsbeeinflussung nicht summieren, sondern im Gegenteil, daß unter der Dicumarolwirkung die Komplementaktivitätsminderung im anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens eher geringfügiger wird.

Eine Abschwächung oder eine Verhütung des anaphylaktischen Schocks durch vorherige Dicumarolverabreichung konnte nicht erzielt werden, obwohl die Abschwächung der intravasalen Gerinnungsvalenz im Spiegel der Prothrombinverminderung sehr stark war und der Prothrombinindex unter 20% lag, also ein Prothrombinspiegel erreicht war, bei dem nach den vorliegenden Erfahrungen bereits eine Gefahr für das Auftreten von Spontanblutungen besteht [13], wenn dieser Prothrombinspiegel durch Dicumarolverabreichung erzielt wurde.

Bei einem Teil der untersuchten Meerschweinchen im anaphylaktischen Schock lag der Prothrombinindex deutlich unterhalb der Norm. Wir nehmen nach unseren früheren Versuchen, bei denen wir im anaphylaktischen Zustand Erhöhung des Antithrombinspiegels feststellen konnten [14] an, daß die Verminderung des Prothrombinzeitindex sich auf das Vorliegen von Inhibitoren zurückführen lassen wird. Eine Parallelität zwischen Prothrombinzeit und Komplementaktivität der Plasmen ließ sich auch bei diesen Versuchen nicht feststellen.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Was die Verminderung der Komplementaktivität unter der Wirkung von Dicumarolverabreichung angeht, stehen unsere Ergebnisse mit hohen Dosen Dicumarol zwischen den Befunden von W. Pfannenstiel [15] und Vinet und Meunier [16], welch letztere bei Kaninchen und Meerschweinchen keine Veränderung des Komplementspiegels durch Dicumarol hatten finden können. Jedenfalls finden wir aber keine Parallelität der Einwirkung von Dicumarol auf Komplement und Prothrombin und aus den Fällen, bei denen keine Minderung der Komplementaktivität bei stärkster Senkung des Prothrombinspiegels gefunden wurde, geht mit Wahrscheinlichkeit hervor, daß Komplement und Prothrombin zwei verschiedene Substanzen bzw. Substanzkomplexe sind. Diese unsere Befunde erweitern andere Beobachtungen über das dissoziierte Verhalten von Komplement und Prothrombin unter der Einwirkung bestimmter Substanzen bzw. Maßnahmen.

So fanden z. B. Milla, Morpurgo und Cominetti[17], daß Injektionen von Vitamin K bei normalen, gesunden erwachsenen Meerschweinchen wohl den Prothrombinspiegel (im Lichte der Prothrombinzeit) aber nicht den Komplementspiegel zu erhöhen vermögen. Bankroft, Quick und Stanley Brown[18] gaben an, daß Chlorazolrot Blutgerinnbarkeit und Komplement different beeinflusse, d. h. die erstere stark hemme, die Komplementfunktionen des Blutes aber nicht. Lusena[19] behauptete, Heparin hemme nur den Gerinnungsvorgang, aber nicht das Komplement (was nach unseren Beobachtungen nur bedingt richtig ist). Schönheyder[20] beobachtete bei seinen Versuchen mit vitamin-K-freier Diät bei Kücken einen Prothrombintitersturz bei normalem Komplementgehalt. Büsing und Zuzak[21] glaubten aber später doch eine Abhängigkeit der Komplementfunktion beim Huhn von der Vitamin-K-Versorgung auf Grund ihrer Experimente annehmen zu müssen. Unsere Beobachtungen zusammen insbesondere mit derjenigen von Bankroft, Quick und Stanley Brown bezüglich Chlorazolrot stellen starke Gegenargumente gegen die Behauptung von v. Falkenhausen und Fuchs dar, daß das Prothrombin das sog. Mittelstück (nach moderner Nomenklatur C_1) des Komplementes darstelle.

Was diese Versuche mit Wahrscheinlichkeit ergaben, sicherten die Versuche mit Adsorptionsmitteln. Es gelang, selektiv das Prothrombin aus den Plasmen vollkommen durch Adsorption zu entfernen, ohne daß die Komplementfunktion aufgehoben worden wäre. Durch parallele Anwendung verschiedener Adsorptionsagentien für Prothrombin in Plasmen verschiedener Spezies konnten die Unstimmigkeiten der Literatur zum Thema der selektiven Trennung von Komplement und Prothrombin durch Adsorption aufgeklärt werden. So fand Fuchs[23], daß nach Ausschütteln von Plasma mit $Ca_3(PO_4)_2$ und auch mit $Al(OH)_3$ weder Prothrombin noch Komplement mehr nachweisbar sei. Dagegen gaben Bankroft, Quick und Stanley Brown[24] an, daß durch $Al(OH)_3$ das Prothrombin aus Plasma entfernbar sei unter Erhaltung des Komplementgehaltes, während bei der Ausschüttelung mit $Mg(OH)_2$ im Plasma Komplement und Prothrombin gleichmäßig abnähme. Unsere Versuche zeigten, daß die Adsorptionsergebnisse in Plasmen sehr stark von der Adsorptionskraft und der angewendeten Dosis der Adsorptionsmittel abhängig ist, und daß die Plasmen darüber hinaus je nach der Herkunft von verschiedenen Tierspezies sich auf dieselbe vewendete Dosis Adsorptionsmittel different verhalten können. Die Adsorptionskraft ist zudem von dem Alter der verwendeten Verbindungen sehr abhängig.

Ein und dieselbe Dosis tertiäres Calciumphosphat hatte z. B. bei in gleicher Weise hergestellten Menschen-, Rinder- und Kaninchenoxalatplasmen ganz differente Effekte bezüglich Adsorption von Prothrombin und Komplement. Auch erwies sich die Individualität von Plasmen innerhalb einer Tierart selbst bei gesunden Tieren als nicht belanglos. Daß diese Ergebnisse nicht durch methodische Fehler vorgetäuscht wurden, schlossen wir aus gleichartigem Ausfall der Adsorptionsergebnisse bei ein und demselben Plasma.

Im einzelnen fanden wir z. B. bei Menschenplasma unter Verwendung von $Al(OH)_3$ die von Fuchs [25] beschriebenen Verhältnisse einer totalen Entfernung von Prothrombin und Komplement aus Plasma, aber die von Bankroft, Quick und Stanley Brown [26] beschriebenen Verhältnisse einer isolierten Entfernung des Prothrombins aus dem Plasma bei Erhaltung des Komplements, wenn wir Kaninchenplasma anwendeten. Daneben fanden wir auch bei gleicher Dosierung desselben Adsorbens teilweise Erhaltung des Prothrombins bei völliger Vernichtung der meßbaren Komplementwirkung. Mit tertiärem Calciumphosphat konnten wir bei unserem Vorgehen aus Menschenplasma das Prothrombin in Proben völlig adsorbieren bei Erhaltung der Komplementfunktion. Bei Verwendung von Kaninchenplasma gelang dies bei gleichartigem Vorgehen mit diesem Adsorptionsmittel nicht völlig, ebenso wenig bei Rinderplasma. Bei der Adsorption mit Magnesiumhydroxyd sahen wir bei Kaninchenplasma einmal völlige Befreiung von Prothrombin bei Verminderung des Komplementes, bei einem anderen Kaninchenplasma fast völlig Entfernung des Prothrombins bei fast ganz erhaltenem Komplement.

Da erwiesen ist, daß die verwendeten Adsorbentien Prothrombin selbst herausadsorbieren und nicht etwa sekundär eine Hemmung desselben im Plasma hervorrufen, konnten wir in dem Falle, in dem wir kein Prothrombin bei erhaltenem Komplement feststellten, eindeutig von wirklicher Trennung von Prothrombin und Komplement sprechen.

Nachdem nun die stoffliche Abtrennbarkeit von Prothrombin und Komplement und Prothrombin unter Aufklärung der Literaturunstimmigkeiten gesichert erscheint, muß man die mehrfach beschriebenen parallelen Alterationen von Prothrombin und Komplement unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Verhältnissen im Organismus durch eine gewisse Ähnlichkeit der Beeinflußbarkeit in vivo und in vitro erklären, die noch analysiert werden muß. Vielleicht hängt ein Teil der beobachteten parallelen Alterationen (z. B. bei Phosphorvergiftung [28]) damit zusammen, daß beide Substanzen bzw. Substanzkomplexe vorzüglich im Leberparenchym gebildet werden [29].

Wenn ein so wichtiger Faktor wie das Prothrombin aus dem Plasma entfernt werden kann, wie aus unseren Versuchen hervorgeht, ohne daß die Komplementfunktion des Plasmas zerstört wird, scheint uns erwiesen, daß das Komplement nicht, wie es die kolloidchemische Betrachtungsweise darzustellen versuchte [27], die Summe der kolloidalen Kräfte des Plasmas oder Serums sein kann.

Daß Heparin in hohen Dosen auch die Komplementfunktion der Plasmen, und zwar anscheinend verschieden bei den Tierarten zu hemmen vermag [30], bestätigten unsere Versuche. Andere Ergebnisse sind vermutlich durch Verwendung anderer Heparinpräparate und anderer Dosierung zu erklären [31].

Da der eine von uns (Marx) zusammen mit H. Dyckerhoff und W. Ziegler früher gefunden hatte [32], daß in Übereinstimmung mit älteren Literaturangaben [33] Heparin bei hoher Dosierung intravasal vor der Reinjektion verabreicht den anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens (Bronchialkrampf) zu verhindern

vermag (in Dosen von etwa 30 mg Heparin je Kilogramm Meerschweinchen), während Neodymazetat, welches in ähnlicher Weise stark gerinnungshemmend wirkt, den Schock nicht sicher zu verhindern vermochte, war uns das negative Ergebnis der Schockverhütung durch Dicumarol nicht verwunderlich. Anscheinend kommt die schockverhütende Wirkung von Heparin größtenteils nicht über den Mechanismus der Blutgerinnungshemmung zustande. Ob die Verminderung der Komplementaktivität bei der schockverhütenden Wirkung hoher Heparindosen beim Meerschweinchen eine Rolle spielt, kann aus den in-vitro-Versuchen nicht sicher beurteilt werden. R. Doerr[34] referiert in seiner Monographie über das Komplement 1947 (Springer, Wien) Arbeiten amerikanischer Autoren[35], welche durch Mutation entstandene komplementfreie Meerschweinchen untersuchen konnten. Leider ist dieser Stamm komplementfreier Meerschweinchen wieder ausgestorben, ohne daß der derzeitigen Beurteilbarkeit der Literatur nach Anaphylaxieversuchen mit diesen komplementfreien Meerschweinchen angestellt wurden. An Hand von Versuchen mit komplementfreien Meerschweinchen wäre wohl die Bedeutung des Komplements für das Auftreten der Symptome des klassischen anaphylaktischen Schocks am besten beurteilbar. Jedenfalls dürfte es interessant sein, komplementhemmende Substanzen auf ihren Einfluß auf den Ablauf allergischer Symptomenbilder zu prüfen.

Inwieweit die schockverhütende Wirkung des Heparins dem Einfluß auf andere mit der Entstehung des anaphylaktischen Schocks im Zusammenhang stehende Substanzen (Histamin, Azetylcholin) beruht und ob die Wirkung mit dem Veresterungsgrad, der Molekülgröße des Heparins zusammenhängt und welches chemische Aufbauprinzip für diese Wirkung verantwortlich ist, soll weiter untersucht werden.

Daß die Antithrombinaktivität des Plasmas oder Serums während des anaphylaktischen Schocks ansteigt, sahen schon früher Dyckerhoff, R. Marx und Ziegler[36]. Allerdings sahen sie dabei keine wesentliche Veränderung der Gerinnungszeit rekalzifizierter Oxalatplasmen. Neuere Untersuchungen von R. Marx und B. Rovatti[37] und R. Marx und A. Vath[38] haben aber gezeigt, daß starke Veränderung der Nativvollblutgerinnungszeit beim Vorliegen mancher Antithrombine bzw. Antiprothrombine von z. B. Heparincharakter in der Plasmagerinnungszeit (Gerinnungszeit rekalzifizierten Oxalatplasmas) wenig deutlich zum Ausdruck zu kommen brauchen. Daß nun im anaphylaktischen Schock ein Teil der Meerschweinchen deutlich verlängerte Prothrombinzeiten aufwiesen, spricht dafür, daß ein Inhibitor der Gerinnung auch beim anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens eine Rolle spielt. Es liegt nahe, im Heparin diesen Inhibitor zu sehen, nachdem bei anderen Tierarten im Schock eine Vermehrung des im Blut vorhandenen Heparins gefunden wurde[39]. Vielleicht hat die Ausschüttung heparinartiger Substanzen bei allergischen Vorgängen und insbesondere im anaphylaktischen Schock den Sinn einer Abbremsung zu heftiger Antigen-Antikörperreaktionen. Ob die beobachtete Verminderung der Komplementaktivität des Plasmas von normalen unbehandelten Meerschweinchen im anaphylaktischen Schock auf die Anwesenheit von komplementhemmenden Substanzen von Heparincharakter oder auf eine Bindung oder Adsorption unspezifischer Art beim Ablauf von Antigen-Antikörperreaktionen oder auf beiden Dingen zugleich beruht, kann zunächst nicht entschieden werden.

Es sei noch erwähnt, daß wir von Scaffidi, Cerbine und Petrelli[40] bestätigen konnten, daß eine Hämolyse im Komplementbestimmungsansatz (mittels Immunohämolysin) nicht erzielt werden kann, wenn Komplement und Erythrozyten von der gleichen Tierart stammen. Eine Erklärung dafür soll hier nicht versucht werden.

Zusammenfassung.

1. Dicumarol senkt den Prothrombinspiegel von Kaninchen und Meerschweinchen sehr stark, während es nur bei einem Teil der Tiere die Komplementaktivität des Plasmas gering vermindert.

2. Vorbehandlung von Meerschweinchen mit Dicumarol verhindert den anaphylaktischen Schock bei Reinjektion von Antigen nicht und schwächt ihn auch nicht ab.

3. Die Prothrombinzeit von Meerschweinchen im anaphylaktischen Schock ist bei einem Teil der Tiere deutlich über die Norm hinaus verlängert bei Abschwächung der Komplementaktivität.

4. Heparin hemmt in hoher Dosis die Komplementfunktionen von Plasmen verschiedener Tierarten. Intrakardial vor der Reinjektion des Antigens in bestimmter Dosis verabreicht, verhütet es beim Meerschweinchen die klassischen Symptome des anaphylaktischen Schocks. Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Heparin den anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens durch Hemmung der Komplementfunktion des Plasmas beeinflußt. Es erscheint wenig wahrscheinlich, daß der gerinnungshemmenden Eigenschaft des Heparins die schockverhütende Wirkung allein zugeschrieben werden kann.

5. Durch selektive Adsorption von Plasmen verschiedener Tierarten mit mehreren Adsorptionsmitteln kann gezeigt werden, daß Prothrombin und Komplement stofflich nichts miteinander zu tun haben und vollkommen voneinander getrennt werden können. Somit kann das Komplement nicht, wie nach der kolloidchemischen Betrachtungsweise angenommen worden war, die Summe der kolloidalen Kräfte des Plasmas darstellen.

6. Die Adsorptionsleistung der verwendeten Adsorbentien für Komplement und Prothrombin ist bei den verschiedenen Spezies different und zeigt auch bei Plasmen ein und derselben Tierart gewisse Unterschiede individueller Art.

Literatur.

[1] Roderick, L. M.: J. amer. vet. med. Assoc. **74**, 314 (1929). — Amer. J. Physiol. **96**, 423 (1931). — Quick, A.: Amer. J. Physiol. **118**, 266 (1931). — Bayerle, H. u. R. Marx: Biochem. Z. **1944**. — [2] Rehn, E. u. K. N. v. Kaulla: Zur klinischen Lösung des Thromboembolieproblems. Stuttgart: Ferdinand Enke 1947. — Halse, Th.: Med. Klin. **6**, 177 (1948). — Marx, R. u. H. Bayerle: Z. ärztl. Forsch. **1948**. — [3] Pfannenstiel, W.: Z. Immunit.forsch. **104**, 166 (1943). — [4] Doerr, R.: Das Komplement. Wien: Springer 1947. — [5] Kaulla, K. N. v.: Münch. med. Wschr. **1943**, Nr 26/27, 399. — [6] Quick, A.: J. biol. Chem. (Am.) **109**, 73 (1935). — [7] Dam, H. u. Glavind: Acta med. scand. (Schwd.) **96**, 108 (1938). — [8] Thordarson, O.: Diss. Aarhus 1941. — [9] Quick, A.: J. biol. Chem. (Am.) **109**, 73 (1935). — [10] Marx, R.: Z. exper. Med. **114**, 18 (1944). — [11] Quick, A.: J. biol. Chem. (Am.) **109**, 73 (1935). — [12] Dyckerhoff, H. u. R. Marx: Biochem. Z.

313, 107 (1942). — [13] Marx, R. u. H. Bayerle: Z. ärztl. Forsch. 1948. — [14] Dyckerhoff, H., R. Marx u. W. Ziegler: Z. exper. Med. 102, 772 (1941). — [15] Pfannenstiel, W.: Z. Immunit.forsch. 104, 166 (1943). — [16] Vinet, A. u. P. Meunier: C. r. Soc. Biol. 138, 58 (1944). — [17] Milla, E., E. Morpurgo and Cominetti: Arch. Sci. Biol. 28, 197 (1942). — [18] Bankroft, F. W., A. J. Quick and M. Stanley Brown: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) 31, 791 (1934). — [19] Lusena, M.: Sperimentale 83, 561 (1929). — [20] Schönheyder, F.: Amer. J. Physiol. 123, 349 (1938). — [21] Büsing, K. H. u. H. Zusak: Z. Immunit.forsch. 102, 349 (1943). — [22] Falkenhausen, v. u. H. J. Fuchs: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1927, 372. — [23] Fuchs, H. J.: Z. Immunit.forsch. 58, 114 (1928). — Arch. exper. Path. (D.) 145, 108 (1929). — [24] Bankroft, F. W., A. J. Quick and M. Stanley Brown: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) 31, 791 (1934). — [25] Fuchs, H. J.: Z. Immunit.forsch. 58, 114 (1928). — Arch. exper. Path. (D.) 145, 108 (1929). — [26] Bankroft, F. W., A. J. Quick and M. Stanley Brown: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) 31, 791 (1934). — [27] Klinke, K.: In Bennhold, Kylin, Rusznyak: Die Eiweißkörper des Blutplasmas. Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopff 1938. — [28] Boyd, W. C.: Fundamentals of Immunology. New York 1943. — Zit. nach R. Doerr: Das Komplement. Wien: Springer 1947. — [29] Olsen, O.: Biochem. Z. 133, 24 (1922). — [30] Fuchs, H. J.: Z. Immunit.forsch. 58, 14 (1928). [31] Lusena, M.: Sperimentale 83, 561 (1929). — [32] Dyckerhoff, H., R. Marx u. W. Ziegler: Z. exper. Med. 102, 772 (1941). — [33] Kyes, Preston and E. R. Strausser: J. Immunol. (Am.) 12, 941 (1926). — Doxiades u. Lemke: Klin. Wschr. 1937 I, 1061. — [34] Doerr, R.: Das Komplement. Wien: Springer 1947. — [35] Moore, H. D.: J. Immunol. (Am.) 4, 425 (1919). — Hyde, R. R.: J. Immunol. (Am.) 8, 267 (1923). — [36] Dyckerhoff, H., R. Marx u. W. Ziegler: Z. exper. Med. 102, 772 (1941). — [37] Marx, R. u. B. Rovatti: Unveröffentlicht. — [38] Marx, R. u. A. Vath: Ärztl. Forsch. 1949. — [39] Ferguson, J. H. and A. J. Glazko: Univ. Hospital. Bull. Univ. of Michigan. Ann. Labor., Vol. VII, p. 27. 1941. — [40] Scaffidi, V., R. Cerbine e C. Petrelli: Riv. Pat. sper. 8, 6 (1932).

Aus dem Pharmakologischen Institut der ehemaligen Universität Breslau.

Periston bei wiederholter Darreichung*.

Von

Franz Barfuss** und Oskar Eichler, Chir. Klinik Heidelberg.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Juli 1948.)

Das Problem des Blutersatzes wurde schon frühzeitig aufgegriffen. Die Erfahrungen des ersten Weltkrieges zeigten, daß der Ersatz verlorenen Blutes zur mechanischen Füllung des Kreislaufes notwendig war; zugleich ergab sich aber, daß die Zufuhr von Kochsalzlösung, selbst von äquilibrierten Lösungen nur eine kurze Besserung brachte.

Es ist natürlich selbstverständlich, daß die Bluttransfusion in dieser Situation die beste Lösung darstellt. Aber dieser Krieg hat gezeigt, daß nicht stets die genügende Zahl der Spender vorhanden ist; andererseits ist das Problem der Blutkonserve wegen ihrer geringen Haltbarkeit keineswegs als gelöst zu betrachten. Leichter haltbar ist die einfache kolloide Lösung und wenn auch die Transportfunktion des Blutes für Sauerstoff an das Vorhandensein der Erythrozyten gebunden ist, so hat sich das doch als ein sekundäres Problem herausgestellt, da meist noch die Zahl der Erythrozyten ausreicht, während rein hämodynamische Faktoren schon früh auftreten. Serumkonserve ist das Nächstliegende und Willenegger[1] sagt sogar, daß das Plasma einen größeren Anwendungsbereich besitze als Vollblut. Auch die Plasmakonserve hat ihre Nachteile[2] und manchmal sind die genügenden „Rohstoffe", d. h. die Zahl der Blutspender nicht vorhanden.

Deshalb war es ganz natürlich, daß man sich nach geeigneten Kolloiden umsah, die leicht sterilisierbar sind und nicht aus dem Blut so rasch verschwinden. Das Gummiarabikum wurde bereits im vorigen Weltkrieg zur Anwendung gebracht, zeigte aber eine Unzahl von Nebenwirkungen[3]. Besonders wurde die langdauernde Speicherung mit ihren Nachteilen auf Bildung von Bluteiweißkörpern usw. betont.

---

* Diese Arbeit wurde schon im Juni 1944 zum Druck eingereicht.

** Dr. Franz Barfuss ist während der Belagerung von Breslau bei der Versorgung eines Verletzten gehorsam gegenüber den ethischen Forderungen des Berufes als Arzt gefallen. Mit ihm ist nicht nur ein ungewöhnlich begabter, ideell gesinnter Jünger der Wissenschaft verloren, ich persönlich beklage den Verlust eines mir menschlich nahestehenden Mannes. O. Eichler.

[1] Willenegger, H.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 614. — [2] Weese, H.: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 555. — [3] Loewe, H.: Klin. u. Prax. **1**, 104 (1946).

Als WEESE[4] deshalb daranging, nach einem anderen Produkt zu suchen, wurde vor allem darauf gesehen, ein möglichst indifferentes Kolloid zu gewinnen. Die verlangten Bedingungen für eine Anwendung wurden durch Periston erfüllt, soweit es die akute Darreichung betrifft.

Die Aufgabe unserer Versuche war es, die Grenze festzulegen, bei der eine Schädigung irgendwelcher Art möglich wäre, und da Periston als negativ geladenes Kolloid[5] in dem Retikuloendothel aufgenommen werden mußte, war die erste Frage, ob sich an diesem Organsystem Änderungen der Funktion nachweisen lassen könnten.

Zur Methodik.

Wir benötigten insgesamt etwa 100 Versuchstiere, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten.

Die Dosierung des Periston wurde so gewählt, daß die Resultate stets zu ungunsten von Periston lagen, wenn man die klinische Anwendung in Betracht zieht. Unser Bestreben war es, auch dem Einwand zu begegnen, daß die Infusionen an Verwundeten vorgenommen werden, die zugleich auch der Gefahr einer Infektion ausgesetzt sind. WEESE[2] verwahrt sich wie uns scheint mit Recht dagegen, daß irgendwelche Veränderungen im Retikuloendothel auf den Menschen übertragen werden, wenn beim Tier ohne vorherige Blutentnahme durch die Gabe des Kolloids eine Peristonplethora erzeugt wird, so daß die regulative Aufnahme ins Retikuloendothel direkt erzwungen wird. Gerade dieses lag aber in unserer Absicht, zudem verbot sich eine tägliche Blutentnahme über längere Zeit von selbst.

Die Zufuhr erfolgte subkutan, da die Aufnahme genügend rasch erfolgt und nichts an der Stelle der Injektion liegen bleibt. Zu diesem Vorgehen waren wir gezwungen. Denn wir verabfolgten das Periston (Molekulargewicht 25000) zu 7,0% in Ringerlösung, also in doppelter Konzentration, wie sie bei der Therapie des Menschen, den kolloidosmotischen Druck des Blutplasmas nachahmend, zur Anwendung kommt. Die Resorption aus dem subkutanen Depot erfolgte langsamer, ohne daß eine Dehydration der Gewebe zu große Ausmaße erlangte. Die Beeinflussung des Retikuloendothels war damit nachhaltig und mehr isoliert. Was wir also durch die fehlende Blutentziehung im Versuch verschärften, milderten wir durch die Art der Zufuhr.

Wir rechneten, daß beim Menschen jeweils 1000 cm³ einer 3,5% Lösung (WEESE bezeichnet diese Menge als das Maximum), d. h. beim 60 kg schweren Menschen rund 0,6 g/kg verabfolgt würde und gaben daher nach unserem Vorhaben das Doppelte, d. h. 1,2 g/kg in 7% Lösung subkutan. Diese Menge erhielten die Tiere täglich bis zu 90 Injektionen, insgesamt also bis zu der ungeheuren Menge von etwa 100 g/kg Periston verteilt auf 3 Monate.

Zur Prüfung der Funktion des Retikuloendothels injizierten wir — diese Versuche erfolgten bei Kaninchen — nach üblicher Weise Kongorot und prüften mit dem photoelektrischen Kolorimeter von HAVEMANN das Absinken der Konzentration im Blutplasma. Als 100% setzten wir dabei die Konzentration fest, die 5 Min. nach der intravenösen Injektion gemessen wurde, denn nach dieser Zeit mußte sich der Farbstoff auf die Gesamtheit des verfügbaren Blutplasmas

[4] WEESE, H.: Med. Z. **1944**, 19. — [5] BENNHOLD, H. u. S. SCHUBERT: Klin. Wschr. **1944**, 30.

verteilt haben, ohne daß eine wesentliche Aufnahme in das Gewebe schon eine Rolle spielen konnte. Von hier aus sank die Konzentration dann etwa linear ab. Nach 75 Min. waren gerade noch kleine Mengen vorhanden, d. h. $< 5\%$ des maximalen Wertes. Nach 90 Min. war nichts mehr nachweisbar trotz der Empfindlichkeit des verwendeten Kolorimeters. Um für eine Störung der Ausscheidung die größtmöglichen Ausschläge zu erhalten, wählten wir als Gradmesser der Aktivität des Retikuloendothels den Wert, der sich 75 Min. nach der intravenösen Injektion der Testlösung von Kongorot im Blutplasma fand.

Nebenbei unterwarfen wir die Organe mit vorwiegender Abfangfunktion körperfremder Partikel, d. h. die Leber und Milz einer histologischen Kontrolle. Stets wurde auch die Niere untersucht, aber ohne daß etwas Krankhaftes sich gezeigt hätte.

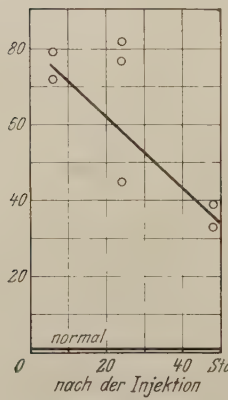


Abb. 1. Kaninchen. Prüfung des Verschwindens von Kongorot aus dem Blutplasma, verschiedene Zeiten nach einer einmaligen Gabe von 1,2 g/kg Periston. 50 Stunden nachher ist der Normalwert noch nicht ganz erreicht.

Wichtig war für uns noch die Nebenniere, weil wir uns fragten, wie dieses Organ, das durch seine Hormone über die Korrektur hämodynamischer Fehler so wacht wie kein anderes, bei der hier auftretenden Belastung reagiere. Daß die Blutmenge zunimmt, ergaben die Verteilungswerte für Kongorot nach 5 Min.

Befunde.

Auf Abb. 1 sehen wir, wie das Kongorot nach einer einmaligen Injektion von Periston in der angegebenen Menge aus dem Blut verschwindet. Es ist tatsächlich eine deutliche Blockade des Retikuloendothels zu bemerken und läßt sich noch 50 Stunden nach der Injektion nachweisen. Der Rückgang wird etwa der im Körper vorhandenen Menge des Periston entsprechen, deren Ausscheidung nach Zipf[6] sich entsprechend lang hinzieht. Es kann sich dabei nicht etwa darum handeln, daß Kongorot nach dem Befund von Bennhold[5] adsorbiert und im Blut zurückgehalten wird, denn Periston hatte gegenüber Gelatine einen „embatischen" Effekt, also begünstigte das Eindringen.

Schon dieser Befund zeigt an, daß ein wesentlicher Nachteil des Gummiarabikum, die übermäßig lange Verweildauer vermieden ist, ebenso wie eine zu flüchtige Wirkung. Unsere Versuche wurden mit dem Periston vorgenommen, dessen Teilchengröße nur wenig um das Molekulargewicht 25000 schwankte, während ein vorher eingeführtes Präparat mit zahlreichen kleinen Partikeln sich in der Wirkung als zu flüchtig erwiesen hatte.

In 24—48 Stunden der Wirkungsdauer des jetzigen Präparates dürfte die Gefahr des akuten Blutverlustes für die Hämodynamik meist durch die eigenen Kräfte des Körpers überwunden sein.

[6] Zipf, K.: Vortrag auf der Tagung der beratenden Ärzte 1944.

Wird die Peristongabe über längere Zeit fortgesetzt, dann zeigt sich diese Hemmung noch deutlicher wie auf Abb. 2.

Ersichtlich ist: Selbst 8 Wochen nach der letzten Gabe ist noch eine kleine Reststörung vorhanden, aber der größte Teil der Störung doch beseitigt, trotz überaus hoher Dosierungen, die insgesamt zur Anwendung kamen. Die längste Behandlungsdauer von 3 Monaten zeigt eine verschleppte Wiederherstellung.

Bei diesen Befunden wird man natürlich die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß wie das Verschwinden des Farbstoffes, so auch die Phagozytose gegenüber Infektionserregern leiden könnte. Wir müssen demgegenüber darauf hinweisen, daß nach der Anlage der Versuche unser Nachweis überaus empfindlich ist. Aber man wird sich nicht der Berechtigung dieses Einwandes verschließen, wenn man dieselbe Störung auch beim Verschwinden von Infektionserregern nachweisen könnte.

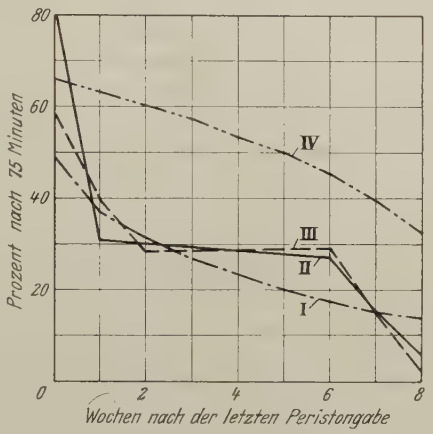


Abb. 2. Jede Kurve gibt die Durchschnittswerte von je 2 Tieren wieder. Die beiden Tiere waren mit Periston behandelt worden. I. 2 Wochen, II. 4 Wochen, III. 6 Wochen, IV. 12 Wochen. Die allmähliche Rückgewinnung der Aktivität des Retikuloendothels wird verfolgt.

Wir wählten dazu in einer weiteren Versuchsserie an Kaninchen einen nicht pathogenen Stamm von Staphylococcus albus und injizierten 10^7 Zellen. Ihr Verschwinden wurde zuerst bei einer Reihe normaler Tiere geprüft. Nach bestimmten Zeiten wurde Blut entnommen, dieses auf die Platten ausgegossen und die Zahl der aufkommenden Kolonien im Mikroskop verfolgt. Es fand sich, daß nach 45 Min. die letzten Kokken aus dem Blut verschwanden. Genau wie beim Kongorot wurde nach dieser Zeit also das Vorhandensein von Erregern im Blut geprüft, nachdem die Tiere 4 Wochen wie oben mit Periston vorbehandelt worden waren und die volle Blockade mit Kongorot erwiesen war.

Es zeigte sich aber keine Verzögerung der Phagozytose. Der Befund erscheint uns wichtig, weil damit zugleich erwiesen ist, daß der Nachweis einer „Blockade" des Retikuloendothels gegenüber Kolloiden im Kongorot durchaus nicht eine Schädigung der Phagozytose bedeuten würde. Für die Beurteilung des Periston ist darauf hingewiesen, daß zudem eine beträchtliche Überdosierung vorlag.

Wie dabei das histologische Bild von Leber und Milz aussieht, den wichtigsten Organen mit Retikuloendothel, können wir aus Versuchen an Ratten auf Abb. 3 und 4 deutlich machen.

Die Organe haben ein völlig verändertes Aussehen erhalten, kaum erkennt man Milz und Leber wieder. Die großen blasigen Zellen sind gefüllt mit dem gespeicherten Kolloid. Solche Bilder sieht man auch nach Gummiarabikum. Auf dem Teil der stärkeren Vergrößerung sieht

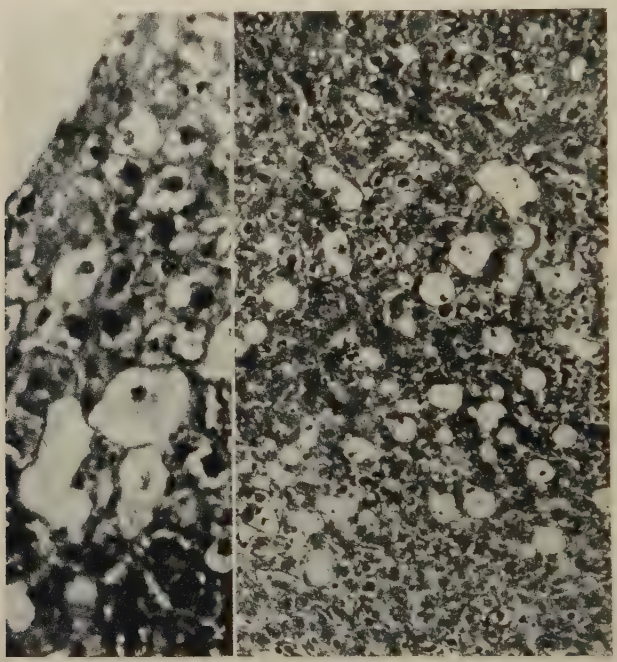


Abb. 3. Leber einer Ratte, die 6 Wochen täglich mit Periston behandelt worden war. Färbung Hämatoxylin-Eosin.

man einige der blasigen Kupferschen Sternzellen, bei denen neben dem kleinen Kern und dem zarten stark flüssigkeitsdurchtränkten Protoplasma sich optisch völlig leere Vakuolen befinden. Man hat an verschiedenen Stellen den Eindruck, daß auch Leberzellen von diesem Prozeß nicht verschont sind, vielleicht als Zeichen einer versuchten Ausscheidung, wenn auch der größte Teil im Urin erscheint.

Wir haben Entwicklung und Verschwinden der histologischen Bilder im Laufe der Versuche verfolgt und bemerkten die ersten gelegentlichen Vakuolen nach 10—20maliger Darreichung von Periston, also nach etwa 10—20 g/kg.

Diese Bilder gehen also nicht der Funktion gegenüber Kongorot parallel, denn auch das Verschwinden dieses Bildes und die Rückkehr

zur Norm, — so daß also nie irgendwelche histologischen Reste sich nachweisen ließen, — erfolgte früher als die Wiedergewinnung der Speicherungsfähigkeit gegenüber Kongorot. Die funktionelle Methode ist empfindlicher.

Wir sind nach dem histologischen Bild noch einen Schritt weiter gegangen und prüften, ob die Leber sonst auch irgendeine Störung ihrer Funktion aufwiese. Wir haben in dieser Richtung zwei verschiedene Methoden angewandt:

1. Die Leberfunktion verfolgten wir durch Belastung mit Phenylbrenztraubensäure, wie Felix und Teske[7] es vorschrieben. Es fand sich kein Anzeichen einer gestörten Funktion.

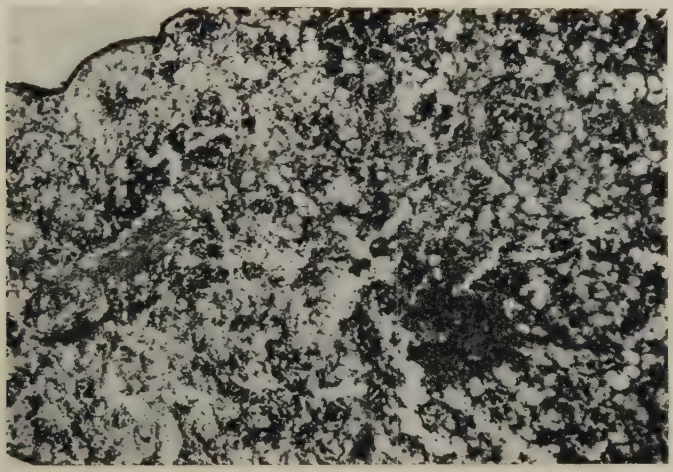


Abb. 4. Milz der Ratte wie in Abb. 4. Färbung Hämatoxylin-Eosin.

2. Wir prüften die Höhe der Bilirubinwerte im Blutplasma nach Jendrassik und Cleghorn[8], die wir für das photoelektrische Kolorimeter von Havemann und auf ganz kleine Blutmengen umarbeiteten[9]. Durch kleine Peristonmengen wird die Farbentwicklung nicht gestört.

Wir geben eine Serie unserer Resultate, die bei Meerschweinchen gewonnen wurden, die über 30 Injektionen von Periston erhalten hatten, auf Abb. 5 wieder. Das Blut wurde durch Herzpunktion entnommen.

Aus den Versuchen können wir entnehmen, daß eine Steigerung des Gehaltes, wie sie nach einer Leberschädigung auftritt und als eine

[7] Felix u. Teske: Hoppe-Seylers Z. **267**, 7 (1941). — Arpe, H.: Klin. Wschr. **1947**. — [8] Jendrassik u. Cleghorn: Biochem. Z. **289**, 1 (1936). — Hinsberg, K. u. K. Lang: Medizinische Chemie. Berlin u. Wien 1938.

[9] Die Einzelheiten sind bei der Belagerung von Breslau und den später erfolgenden Austreibungen verlorengegangen.

der empfindlichsten Proben gelten kann, nicht zu beobachten ist. Dagegen sieht man bei 3 Tieren Werte, die gerade noch am unteren Rande der Norm liegen, ja ihn schon nicht mehr erreichen. Man würde die Abweichungen nicht beachten, wenn nicht bei den anderen Tieren deutlich niedere Werte, bei zweien unzweifelhaft abnormal niedere Werte zur Beobachtung gekommen wären.

Es ist nicht schwer, sich von dem Zustandekommen dieser Tendenz zur Erniedrigung eine eindeutige Vorstellung zu machen. Da Bilirubin wesentlich vom Retikuloendothel gebildet wird, werden wir in diesen Werten einen weiteren Hinweis auf eine gewisse Hemmung dieses Zellsystems erblicken. Solche Hemmung kann nun auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. 1. In verringertem Umsatz des Hämoglobins, 2. in dem verminderten Abbau zum Zerfall und zur Auflösung reifer Erythrozyten, als erstem Schritt zur Verarbeitung.

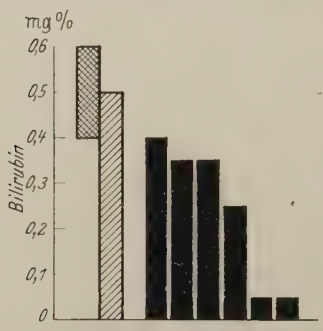


Abb. 5. Einfach schraffierte Kolonnen: Durchschnittswerte nach Prüfung an 10 normalen Tieren. Doppeltschraffierter Stab gibt die Schwankungsbreite (nicht Streuung) der Werte an. Schwarze Kolonnen: Die Werte bei 6 Tieren, die mindestens 1 Monat mit Periston 1,2 g/kg/Tag behandelt wurden.

Wenn der zuletzt genannte Effekt sich als führend erwiese, würden wir das durchaus begrüßen können. Denn die zur Auflösung bestimmten Blutkörperchen werden noch ihre Funktion versehen können, auch wenn sie vom Standpunkt des gesunden Organismus überaltert sind. Da durch eine Blutung aber ohne Wahl alte und junge Erythrozyten verlorengehen, werden wir sagen, daß bei Mangel besser alte sind als gar keine. Der beobachtete Effekt könnte sich also dann als vorteilhaft erweisen. Jedoch ist eine Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten nicht erfolgt.

Als letzten Befund haben wir noch auf die histologischen Bilder der Nebennierenrinde auf Abb. 6 einzugehen.

Auf dem Bilde ist keine Speicherung von Periston zu sehen. Wir sehen nur einen Schwund des in den äußeren Rindenschichten vorhandenen Lipoids. Die Vakuolenbildung ist schon auf dem Bilde nicht zu vergleichen mit der Peristonspeicherung, wie wir sie in Milz und Leber auf den Abb. 3 und 4 wiedergeben. Wir halten es für völlig ausgeschlossen, daß eine chemisch so indifferente Substanz wie Periston durch eine chemische Einwirkung, d. h. durch die ihr innewohnende Eigentoxizität zu diesen Bildern Anlaß geben könnte. Handelte es sich um eine toxische Störung, dann würde man bei der Lebenswichtigkeit dieser Drüse irgendwelche Zeichen schlechten Befindens bemerken. Den Tieren ging es aber gut, sie fraßen und nahmen an Gewicht zu.

Deshalb fassen wir diese Veränderungen als die Folgen der hämodynamischen Veränderungen auf, die unausbleibliche Folgen der fortgesetzten Gabe des Kolloids sind. Wir verwenden also körperfremde Substanz, wie wir es stets gewohnt sind, als Mittel, um die physiologischen Zusammenhänge zu ergründen. Unser Verfahren gleicht dabei dem des Physikers, der an einem mechanischen System ohne Trennung des inneren Zusammenhanges eine virtuelle Verrückung vornimmt, um die inneren Kräfte des Systems zu erkennen. Denn die Nebennierenrinde hat einen Einfluß auf die Hämodynamik. Um histologische

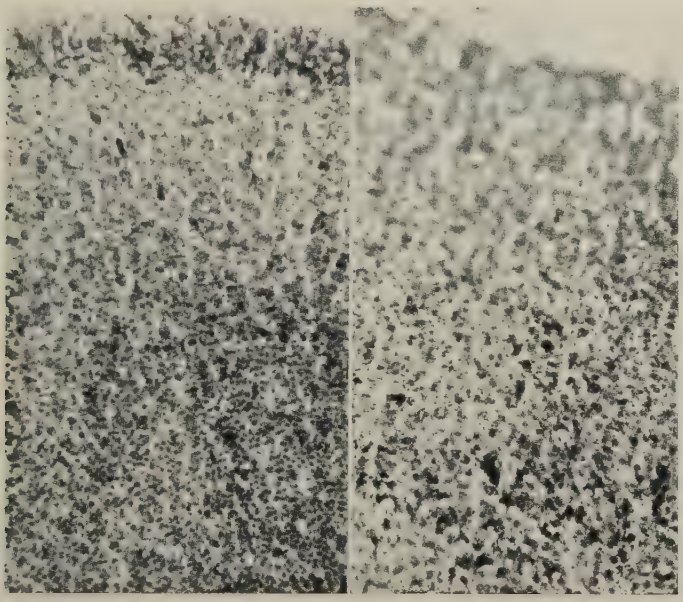


Abb. 6. Sudanfärbung. Nebennierenrinde der Ratte. Das linke Bild stammt von einem normalen Tier, das rechte von einem Tier, das etwa 50mal die Standarddosis von Periston erhalten hatte. Die starke Färbung der Zona glomerulosa links ist auf dem rechten Bild geschwunden, ebenso wie die der Zona fasciculata. Die Zellen zeigen Vakuolen, die nicht mit den Vakuolen der Peristonspeicherung zu verwechseln sind.

Veränderungen zu verfolgen, ist dabei nach Eger[10] gerade die Ratte besonders geeignet, weil die normalen Tiere ein besonders gleichmäßiges Aussehen der Rinde zeigen.

Zuerst werden wir uns die Frage vorlegen, ob es sich hier um eine verminderte oder erhöhte Aktivität des Organs handelt. Eindeutige Versuche zur Erzeugung einer verminderten Aktivität finden wir in den Versuchen von Ingle, Higgins und Kendall[11]. Sie führten ihren Ratten durch das Trinkwasser größere Mengen „Cortin" zu und verfolgten sowohl das histologische Bild als auch die Gewichte der Nebenniere. Zunehmend mit Dosis und Dauer der Zufuhr zeigte sich eine Abnahme des Organgewichtes, schon nach 3—4 Tagen beginnend, bis zum Maximum nach 14 Tagen. Der Verlust an Gewicht ging ausschließlich auf die Nebennierenrinde zurück, deren Breite schließlich nur um die Hälfte der

[10] Eger, W.: Virchows Arch. **309**, 811 (1942). — [11] Ingle, D. J., G. M. Higgins u. E. C. Kendall: Anat. Rec. (Am.) **71**, 363 (1938).

der unbehandelten Tiere betrug. Die Zellen waren kleiner als bei der normalen Drüse, die Kerne dicht gepackt mit kleinem Zytoplasma, meist mangelnden Lipoideinschlüssen. Diese Veränderungen konnten verhindert werden durch gleichzeitige Zufuhr von kortikotropem Hormon der Hypophyse, während Exstirpation der Hypophyse zu ähnlichen Bildern führt, so daß die Autoren die Auffassung vertraten, daß durch den Überschuß an Hormon die Hypophyse beeinflußt werde entsprechend den Befunden in anderen Drüsen mit innerer Sekretion.

Unsere Befunde, von denen wir als Beispiel Abb. 6 wiedergeben, sind in keiner Weise mit dem oben beschriebenen Bilde von Ingle und Mitarbeitern[11] zu vergleichen. Es handelt sich also nicht um eine Atrophie, die durchaus möglich wäre, da wir zuerst annehmen müssen, daß die Regulation nur in Richtung eines versagenden Kreislaufs liegt, was hier nicht in Frage kommt. Unsere Bilder gleichen dagegen denjenigen, wie sie von Eger[10] erhalten wurden.

Nach der Auffassung von Staemmler[12] deutet ein erhöhter Vakuolengehalt auf gesteigerte Zelltätigkeit, wie er es bei seinen Untersuchungen des Nebennierenmarkes nachweisen konnte. Und Eger konnte durch experimentelle Zustände, die in einer Belastung der Nebennierenrinde bestehen mußten, sowohl Vakuolenbildung als auch Verlust des Lipoids erzielen. Dabei darf man nicht die lipoiden Substanzen einfach mit dem Gehalt oder der Produktion von Hormon gleichsetzen. In der Zona glomerulosa soll vor allem das Desoxykortikosteron gebildet werden, das vorwiegend über den Mineralstoffwechsel in den Geweben wacht[14] und gerade diese Zone zeigt sich bei uns noch mehr betroffen als in den Egerschen Versuchen.

Als Methoden der funktionellen Beanspruchung wandte er unter anderem neben Belastung des Kohlenhydrathaushaltes plötzlichen Entzug des Na in der Diät an. Da nach den heutigen Vorstellungen das Rindenhormon ganz wesentlich den Na- und Wasserhaushalt dirigiert, wird man das verstehen. Büttner und Schlegel[13] unterwarfen ihre Versuchspersonen weitgehenden Schwitzprozeduren, bis sie durch den Verlust des NaCl durch den Schweiß eine so starke Verminderung der Blutmenge erreichten, daß sie den Versuch wegen Kollapsgefahr abbrechen mußten. In diesem Zustand konnten sie durch Gabe von Rindenhormon diesen Kollaps etwas hinausschieben, zugleich wurde vermehrt Na im Schweiß abgegeben. Das zeugt dafür, daß durch Mobilisierung von Na die Blutgefäße vorübergehend aufgefüllt wurden, bis auch diese Mengen im Schweiß verschwanden. Also wird durch das Nebennierenrindenhormon die Blutmenge vermehrt. Dieser Zustand ist genau entgegengesetzt dem von uns mit Periston erzielten. Kürzlich hat Martha Vogt[15] durch zahlreiche Injektionen von Adrenalin dieselben Veränderungen im histologischen Bilde erzielt wie wir. Das wäre eher

[12] Staemmler, M.: Beitr. path. Anat. **91**, 30 (1933). — [13] Schlegel, B. u. H. Böttner: Klin. Wschr. **1942**, 533. — [14] Deane, H. W. u. J. H. Shaw: J. Nutrit. (Am.) **31**, 1 (1947).

[15] Vogt, M.: J. Physiol. (Brit.) **106**, 394 (1947). Ebenso wird durch höhere (39°) und niedere (2—4°) Temperaturen schon in wenigsten Stunden und Insulingabe dasselbe erzielt. Ob bei Insulin die regulative Adrenalinausschüttung zu diesen Erfolg führt, ist nicht zu entscheiden, da die Nebennierenrinde auch mit dem Kohlenhydratstoffwechsel zu tun hat. Extreme Temperaturen führen nach Staemmler zur Adrenalinausschüttung.

ein Zustand, wie wir ihn hatten, in dem die Blutmenge im Verhältnis zum möglichen Gefäßinhalt bei normalem Blutdruck zu groß wurde.

Wir würden deshalb die Funktion des Hormons in der Richtung suchen, daß es die Blutmenge reguliert. Unter dieser Auffassung wäre dann die Regulation des Na-Wasserhaushaltes einbegriffen. Die Vorstellung, daß eine Substanz über die Regulation wacht, d. h. bei Veränderungen nach beiden Richtungen eingesetzt wird, hat etwas Unbefriedigendes, wenn man an die Funktion der Zellen an sich denkt. Jedoch hat Rein gerade vom Adrenalin solche entgegengesetzten Funktionen nachgewiesen. Das ist bei diesem Körper leichter, weil wir den Angriffsort — die Gefäßwandungen — wenigstens kennen, während wir vom Nebennierenrindenhormon nichts wissen, als daß es eben in der Lage ist, aus dem Bindegewebe Na zu mobilisieren, zugleich die Ausscheidung durch die Niere zu hemmen, d. h. die Rückresorption zu verbessern. Zugleich wird aber die Aufnahme von Na in die Muskulatur verbessert[16]. Das ließe sich unter der gemeinsamen Funktion Transport vom Na begreifen. In dieses Bild paßt nicht hinein der neuerliche Befund, daß durch Corticosteron eine Verengerung der Gefäße erzielbar ist, allerdings in hoher Dosierung. Für unser Thema bedeutet diese Diskussion jedenfalls, daß Periston nicht direkt auf die Nebennieren einwirkt, sondern daß sich das erhaltene Bild in andere Befunde einfügt.

Zusammenfassung.

Es wird an etwa 100 Tieren (Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten) geprüft, ob Periston bei übermäßiger Zufuhr im chronischen Versuch zu irgendwelchen Schädigungen Anlaß gibt.

Nach einmaliger Gabe, vermehrt nach wiederholter Zufuhr, zeigt sich eine Blockade des retikuloendothelialen Systems, indem Kongorot langsamer aus dem Blut verschwindet. 50 Stunden nach einer hohen Dosis ist der größte Teil der Funktion wiederhergestellt entsprechend der Zeit, in der Periston im Körper bleibt.

Nach häufig wiederholter Zufuhr zieht sich die Rückkehr zur Norm mehrere Wochen hin.

Wenn man bei maximaler Bockade Staphylokokken injiziert, zeigt sich trotzdem die normale Geschwindigkeit der Phagozytose.

In Milz und Leber finden sich Vakuolenbildung in den Zellen als Zeichen der Aufnahme des körperfremden Kolloids aus dem Plasma. Diese histologischen Veränderungen bilden sich in einigen Wochen ohne Residuum zurück.

[16] Eichler, O.: Die Hofmeistersche Reihe. Im Druck in Heffter-Heubners Handbuch, Erg.-W., Bd. X. Daselbst ausführliche Darlegung.

In der Niere lassen sich nie Veränderungen nachweisen.

Trotz der im histologischen Bild veränderten Struktur der Leber ist der Abbau von Phenylbrenztraubensäure normal, der Bilirubingehalt sogar erniedrigt. Dieses kann bedingt sein durch eine Störung des Retikuloendothels, die man aber nicht als nachteilig auffassen muß.

Veränderungen in der Nebennierenrinde im Sinne erhöhter Aktivität sind als Zeichen der Regulation wegen veränderter Hämodynamik aufzufassen, nicht als unmittelbare Peristonfolge.

Also ergeben unsere Versuche, daß selbst übermäßig hohe Dosen von Periston keine Dauerschäden nach sich ziehen, daß also die in der Therapie beim Menschen üblichen Mengen bedenkenlos gegeben werden können.

Benetzung als Wirkungsfaktor *.

Von

S. Loewe,

Salt Lake City, Utah, USA.

(Eingegangen am 14. Juli 1948.)

In ausgedehnten Untersuchungen über die abführende Wirkung des Phenolphthaleins stellte sich heraus, daß kein tierisches Testobjekt existiert, das die Abführwirkung so anzeigt, wie sie sich am Menschen abspielt — mit einziger Ausnahme des neuerdings für solche Studien als zuverlässig erwiesenen Rhesusaffen. An einem ständig ergänzten Bestand von 60 solchen Tieren war es möglich, eine Frage zu lösen, die durch praktische Erfahrungen über die Wirksamkeit verschiedener Phenolphthaleinpräparate am Menschen aufgeworfen wurde: Es erschien nämlich ein gelbgefärbtes, nicht völlig reines Phenolphthalein mehrfach wirksamer als weiße, chemisch reine Produkte.

Die zu dieser Erfahrung geäußerten Erklärungsversuche vermuteten entweder ein stärker wirksames Nebenprodukt oder eine höhere Dispersion des unreinen gelben Phenolphthaleins. Diese Hypothesen wurden geprüft, aber nicht als richtig befunden, während die Versuche eine andere Erklärung in den Vordergrund rückten.

Methodik.

Die Prüfung auf abführende Wirkung mußte individuell erfolgen, weil die Empfindlichkeit der einzelnen Affen stark variierte, während jeder für sich auf wiederholte Dosen mit ausreichender Konstanz antwortete. Sämtliche Vergleichsmessungen über den Wirkungsgrad verschiedener Produkte wurden also am gleichen Individuum vorgenommen, und erst dann die intraindividuell gewonnenen Vergleichswerte von verschiedenen Tieren zur Auswertung der Wirkungsstärke biostatistisch integriert.

Konsistenzverminderung des normalerweise festen Kotes erwies sich als einfachstes und unzweideutigstes Kennzeichen der Abführwirkung. Breiige und flüssige Beschaffenheit der Stühle bildeten zum Vergleich benutzbare Stufen der Wirkungsstärke. In geeigneten Fällen wurde auch die Dauer der Konsistenzveränderung zur Bewertung der Wirkungsstärke herangezogen. Als Maßstab einer Wirkungsverstärkung des Phenolphthaleins durch Begleitsubstanzen diente die

* Auszug aus einem Manuskript, das Verfasser unter dem Titel „Die Geschichte vom gelbblinden Affen" Herrn Prof. Wolfgang Heubner aus Anlaß seines 70. Geburtstages in Freundschaft und Verehrung widmete.

„spezifische Wirkungsstärke", d. h. das Prozentualverhältnis der gefundenen zu der additiv, nach Wirkungsstärke und Mengenanteil der Komponenten zu erwartenden Wirkungsstärke.

Experimentelles.

Im Durchschnitt von mehreren tausend Versuchen standen gleich wirksame Dosen von gelbem und weißem Phenolphthalein im Verhältnis von 1:2,96, entsprechend einer spezifischen Wirkungsstärke von 302 für das gelbe Produkt. Doch gab es bei den einzelnen Affen auch erhebliche Abweichungen dieses Verhältnisses nach oben (bis 1:8) und nach unten (bis 1:1). Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte aus einem Material von mehr als 350 Affen.

Die Begleitstoffe von gelbem Phenolphthalein ließen isoliert oder in Extrakten angereichert niemals eine ausreichende Eigenwirkung erkennen, noch erhöhten sie, wenn mechanisch mit Phenolphthalein gemischt, die spezifische Wirkungsstärke. Durch Ausfällung von Phenolphthalein, teilweise in Gegenwart von Schutzkolloiden, ließen sich Präparate mit sehr verschiedener Korngröße herstellen; ihre Prüfung am Affen ergab jedoch keinerlei Abhängigkeit der Wirkungsstärke in dem Sinne, daß er dem Dispersionsgrad proportional gewesen wäre, vielmehr waren die feststellbaren Variationen ganz regellos.

Diese Befunde widerlegten die bisherigen Hypothesen über den Unterschied der Wirkungsstärke der beiden Phenolphthaleinprodukte und schlossen pharmakodynamischen Synergismus zwischen Phenolphthalein und Begleitstoffen des gelben Produkts aus.

Während die spezifische Wirkungsstärke von Mischungen weißen Phenolphthaleins mit den Begleitstoffen des gelben Produkts nicht erhöht war, erreichten Produkte, die durch Lösung solcher Mischungen in Alkali und Wiederausfällen durch Säure bereitet waren, die spezifische Wirkungsstärke von gelbem Phenolphthalein. Umgekehrt wurde die spezifische Wirkungsstärke gelben Phenolphthaleins von 300 bis nahezu 100 reduziert, wenn das Handelsprodukt in organischen Lösungsmitteln gelöst und durch Verjagen des Lösungsmittels unvermindert wiedergewonnen wurde. Auch Kombinationen von Phenolphthalein mit zahlreichen nicht im gelben Handelsprodukt vorkommenden Stoffen von so verschiedener Art wie z. B. Thymolphthalein, Sudanfarbstoff und Schwefelverbindungen zeigten sich von hoher spezifischer Wirkungsstärke, jedoch gleichfalls nur, wenn sie durch gemeinsame Fällung der Bestandteile erzeugt wurden. Diese Befunde legten den Gedanken an eine Aktivierung durch Veränderung des physikalisch-chemischen Verhaltens der Pulverteilchen des Phenolphthaleins nahe. Daß unter Umständen schon die Beimengung von nur 1 Teil des Aktivators zu 999 Teilen Phenolphthalein die höchste spezifische Wirkung

erzielte, ließ daran denken, daß die Veränderung die Teilchenoberfläche betrifft. Daß ähnliche Zusätze auch andere abführende Phthalide, und nach vorläufigen Versuchen auch andere schwer wasserlösliche Wirkstoffe aktivierten, erhöhte den Anreiz, den Aktivierungsmechanismus aufzuklären.

Vergleicht man das Verhalten der beiden Phenolphthaleinarten des Handels beim Eintragen kleiner Mengen in ein wassergefülltes Reagenzröhrchen, so sieht man, daß die Teilchen des reinen Produkts niedersinken, während die des gelben Produkts trotz gleicher spezifischer Schwere schwimmend auf der Oberfläche verharren. Diese sind also offensichtlich weniger benetzbar.

Es wurden nun Methoden ausgearbeitet, um die Benetzbarkeit von Pulverteilchen — oder die ihr reziproke Eigenschaft der Repellenz — gegenüber dem Medium Wasser quantitativ zu bestimmen. Die für große Reihenversuche bestgeeignete Methode bestand darin, diejenige Konzentration eines passenden Benetzungsmittels von polar-apolarer Beschaffenheit, wie z. B. Cetylpyridiniumchlorid, zu ermitteln, bei der 90% einer abgemessenen Pulvermenge unter sonst gleichen Bedingungen zu Boden sinken.

Mit dieser Methode konnte tatsächlich die höhere Repellenz der Begleitstoffe des Phenolphthaleins in den gelben Handelsprodukten bestätigt und zahlenmäßig definiert werden. Es zeigte sich weiter, daß zwar der Grad der Repellenz in vitro und die spezifische Wirkungsstärke keineswegs immer parallel liefen, daß aber a) alle Aktivatoren Repellentien waren und b) alle erfolgreich aktivierten Produkte erhöhte Repellenz besaßen.

Theoretisches.

Die gefundenen Beziehungen lassen sich vielleicht verstehen, wenn man davon ausgeht, daß die Löslichkeit des Phenolphthaleins in Wasser sehr gering ist. Es läßt sich berechnen, daß die während eines Verdauungsaktes in den Darm ausgeschiedene Wassermenge knapp ausreicht, um die zur abführenden Wirkung erforderliche Dosis Phenolphthalein überhaupt in Lösung zu bringen. Die Überführung des Phenolphthaleins vom wasserbenetzten Pulverteilchen zum Darmwandgewebe erfolgt zwangsläufig auf dem Wege der Lösung in der angrenzenden Schicht wäßrigen Dispersionsmittels und die Überführungsgeschwindigkeit ist durch die geringe Löslichkeit begrenzt. Vom Wasser nicht benetzte Pulverteilchen hingegen „flottieren", d. h. sie neigen dazu, die Grenzfläche des wäßrigen Dispersionsmittels mit dritten, hydrophoben Phasen aufzusuchen. Im Darmkanal bedeutet das, wofern apolare Oberflächen, etwa von lipoiden Zellbestandteilen, vorhanden sind, einen Kurzschluß, der die Überführung des Wirkstoffes vom

Teilchen zum Substrat unter Umgehung des verlangsamenden Faktors der Wasserlöslichkeit ermöglichen kann.

Repellenz kann somit Werkzeug einer Resorptionsbeschleunigung und Wirkungsverstärkung sein. Daß Flottierung „Flotoaktivierung" nicht unbedingt verbürgt, wird durch Beispiele verständlich gemacht, in denen hohe Repellenz in vitro nicht zur Aktivierung führte. Das war der Fall, wenn die Aktivatoren entweder Fette waren, deren stark repellent machende Teilchenüberzüge vorzeitig wegverdaut werden, oder umgekehrt, unangreifbare Wachse, wie sie zur wetterfesten Imprägnierung von Textilien verwendet werden; diese verringerten sogar die spezifische Wirkungsstärke reinen Phenolphthaleins. Flotoaktivierung hätte demnach noch einige weitere verständliche Voraussetzungen, neben denen der unzureichenden Wasserlöslichkeit des Wirkstoffs und der Flottierbarkeit seiner Teilchen durch Repellenz: nämlich genügende Haftfähigkeit der unbenetzbaren Oberflächenschicht und anhydrophile Überführbarkeit des Wirkstoffs vom Teilchen zum Substrat. Diese letztere Eigenschaft setzt wohl bestimmt Lipoidaffinität des Wirkstoffs, aber außerdem auch eine Vermittlerfähigkeit des trennenden Überzugmaterials voraus, die gleichfalls in dessen Mischbarkeit mit Zellipoiden begründet sein könnte.

Die Verschiedenheit, mit der der Aktivierungsgrad des gleichen gelben Phenolphthaleins bei verschiedenen Affen zum Ausdruck kommt, läßt sich aus Verschiedenheiten der Konzentration der im Darmsaft vorkommenden, dem Repellenzfaktor entgegenarbeitenden Benetzungsmittel, vor allem also der gallensauren Salze verstehen.

Die im vorstehenden versuchte Erklärung, *warum* die beschriebenen Eigenschaften die Wirkungsstärke variieren, ist natürlich hypothetischen Charakters. Ohne Ansehung des Mechanismus mag es jedoch genügen, einen bisher kaum beachteten Faktor im lokalen und regionären, unter Umständen auch resorptiven Wirken von Arzneistoffen aufgewiesen zu haben, nämlich den Benetzungsgrad pulverförmiger und schwer wasserlöslicher Substanzen.

Genaueres über die dargelegten Erscheinungen und Untersuchungen findet sich bei S. Loewe und Ida A. Loewe[1].

Zusammenfassung.

Am Beispiel der abführenden Wirkung des Phenolphthaleins wird gezeigt, daß Unterschiede der Benetzbarkeit die Wirkungsstärke schwerlöslicher, in Pulverform verabreichter Pharmaka sehr erheblich beeinflussen: Verminderung der Benetzbarkeit mit Wasser *erhöhte* die Wirkungsstärke.

[1] Loewe, S. u. Ida A. Loewe: J. Pharmacol. (Am.) im Druck.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol.

I. Mitteilung.

Akute Vergiftung mit m-Dinitrobenzol.

Von

Manfred Kiese.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. Oktober 1946.)

Im Vergleich zu anderen Nitrobenzolen, wie dem Mononitrobenzol oder Trinitrotoluol, hat das m-Dinitrobenzol bisher eine weniger eingehende pharmakologische Bearbeitung gefunden. Die Darstellungen seiner Wirkungen in den Lehrbüchern (z. B. Lewin[1], Flury-Zernick[2]) gründen sich vornehmlich auf einige ältere Untersuchungen wie die von Röhl[3], Huber[4] und Strassmann und Strecker[5] und auf einige gewerbetoxikologische Beobachtungen. Im Rahmen einer größeren Reihe von Untersuchungen über die Pharmakologie aromatischer Amine und Nitroverbindungen, die Heubner[6] insbesondere zur Aufklärung der Hämiglobinbildung durch diese Stoffe durchführen ließ, haben Heubner und Lo Sing[7] und v. Issekutz[8] in neuerer Zeit einige Messungen der Hämiglobinbildung gemacht. Wir haben im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen und veranlaßt durch das gewerbetoxikologische Interesse umfangreiche Untersuchungen mit m-Dinitrobenzol durchgeführt, die in mancher Hinsicht weiteren Einblick in den Ablauf der Wirkung des m-Dinitrobenzol gewähren und eine Grundlage für eine bessere Beurteilung der Vergiftung bieten. Ein Teil der Arbeit ist leider verlorengegangen. Die folgende Beschreibung ist nur auf die noch erhaltenen Protokolle gegründet, die hier unterbreitet werden. Für einige Beobachtungen lagen noch kurze zusammenfassende Auszüge vor, die erkennen ließen, daß die Mittel aus der kleineren Zahl von Versuchen von denen aus einer größeren Zahl von Versuchen nur unwesentlich abweichen; ihre Fehler sind freilich etwas größer.

---

[1] Lewin, L.: Gifte und Vergiftungen. Berlin 1929. — [2] Flury, F. u. F. Zernik: Schädliche Gase. Berlin 1931. — [3] Röhl, G.: Diss. Rostock 1890. — [4] Huber, A.: Virchows Arch. **126**, 240 (1891). — [5] Strassmann, G. u. Strecker: Bl. gerichtl. Med. **47**, 241 (1896). — [6] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — [7] Heubner, W. u. Lo Sing: Arch. exper. Path. (D.) 188, 143 (1938). — [8] Issekutz, B. v. jr.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 551 (1939).

Untersuchungen über die Wirkung des m-Dinitrobenzols an Meerschweinchen und Katzen, die im Anschluß an unsere Versuche durchgeführt wurden, haben Kunz[9] und v. Bredow und Jung[10] bereits mitgeteilt. Wir werden auf diese Untersuchungen beim Vergleich der Wirkung auf verschiedene Tiere zurückkommen.

Qualitativ waren alle wesentlichen Wirkungen des m-Dinitrobenzols durch die älteren Untersuchungen bekannt. Huber[4], den das Auftreten einer Zyanose bei zwei Studenten, die Dinitrobenzol herstellten, zu seinen Untersuchungen veranlaßte, beschreibt sie bereits: Braunfärbung des Blutes (Hämiglobinbildung), „helle stark lichtbrechende runde Anhängsel" (Heinzsche Körperchen) an den roten Zellen, Anämie, beginnende Leberverfettung, Lähmungen und Krämpfe.

Methoden.

Die Versuche wurden an Hunden durchgeführt. In Olivenöl oder Mohnöl zu 1—2% gelöst wurde das m-Dinitrobenzol den Hunden auf mehrere Stellen verteilt subkutan injiziert. Nach der Injektion des m-Dinitrobenzols wurden die Tiere meist zur Beobachtung im Stoffwechselkäfig im Laboratorium gehalten. In vielen Fällen wurde die Vergiftung der Hunde nach mehreren Tagen noch einmal oder mehrmals wiederholt.

Es wurden untersucht: im Blut der Gehalt an roten Zellen, weißen Zellen, Retikulozyten, Zellen mit Heinz-Körperchen, Gesamtblutfarbstoff, Hämiglobin, Verdoglobin, Gallenfarbstoff, ferner die osmotische Resistenz der roten Zellen. Im Harn der Gehalt an Protein, Gallenfarbstoff, Urobilin, Urobilinogen. Bei Tieren, die infolge der m-Dinitrobenzol-Wirkung starben, wurden histologische Untersuchungen der verschiedenen Organe durchgeführt. Die Zahl der roten und weißen Zellen wurde in der üblichen Weise in der Thoma-Zeissschen Zählkammer bestimmt. Heinz-Körper und Retikulozyten wurden im Ausstrich, der in der feuchten Kammer mit Nilblau oder Kresylblau gefärbt war, ausgezählt. Hämiglobin wurde mit der Methode von Evelyn[11] und Havemann[12] bestimmt. Gesamtblutfarbstoff wurde nach Oxydation zu Hämiglobin ebenfalls indirekt als Hämiglobin gemessen (Kiese[13]). Verdoglobin wurde mit dem Verfahren von Kiese[13] gemessen, Bilirubin nach Kopplung mit Diazobenzolsulfosäure in saurer Lösung ebenfalls photometrisch bestimmt. Für alle photometrischen Messungen wurde das Photometer von Havemann[14] benutzt. Zur Bestimmung

[9] Kunz, G.: Arch. exper. Path. (D.) **199**, 508 (1942). — [10] Bredow, M. v. u. F. Jung: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 335 (1942). — [11] Evelyn, K. A. u. H. T. Malloy: J. biol. Chem. (Am.) **126**, 655 (1938). — [12] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz jr.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [13] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1942**, 565. — [14] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105; **306**, 224 (1939).

der osmotischen Resistenz der roten Zellen wurde eine konstante Menge Blut in Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration gegeben und der Hämolysegrad durch Messung des Hämoglobingehalts der überstehenden Lösung ermittelt.

1. Allgemeine Beschreibung des Vergiftungsverlaufs.

Einmalige Dosen von 1 oder 2 mg/kg m-Dinitrobenzol hatten keine feststellbaren Wirkungen bei Hunden. 10 mg/kg wirkten bei etwa der Hälfte der Tiere tödlich, nämlich bei 9 von 19 Hunden. Dosen von 20 mg/kg töteten 9 von 12 Hunden. Demnach ist die mittlere tödliche Dosis nahe bei 10 mg/kg anzunehmen.

Nach Dosen von 10 oder 20 mg/kg wurden erst nach einigen Stunden Veränderungen äußerlich wahrnehmbar. Nach 3—5 Stunden wurden auch die lebhaftesten und angriffslustigsten Hunde ruhiger und machten bald einen müden Eindruck. Einige Tiere liefen dann schon ein wenig unsicher oder konnten sich (nach 20 mg/kg m-Dinitrobenzol) nur mehr mühsam auf den Beinen halten. Meist war um diese Zeit auch schon eine dunklere Färbung der Zunge und Schleimhäute des Maules, Zyanose, zu beobachten. Es gab freilich wenige mit 10 mg/kg vergiftete Tiere, deren Allgemeinzustand durch die Wirkung des m-Dinitrobenzol nur wenig beeinträchtigt wurde. Die meisten Tiere, insbesondere die mit 20 mg/kg vergifteten, nahmen in den folgenden Stunden Seitenlage ein. Bei einigen Hunden traten auch schon um diese Zeit Krämpfe auf. Ihr Beginn war meist sehr plötzlich, selten gingen ihnen kurze Anfälle spastischer Versteifung der Glieder voran. Ein Hund, der eine Dosis von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol zunächst gut überstanden hatte, bekam noch nach 10 Tagen, als er im Laboratorium umherlief, plötzlich Krämpfe, die mehrere Tage anhielten. Der Streckkrampf mit starkem Opisthotonus ging meist schnell in Laufbewegungen der gestreckten Glieder über. Auch wenn diese vorüber waren, blieben die Beine meist noch steif. Durch geringe Reize wie ein leichtes Klopfen an die Tür des Käfigs konnten neue Krampfanfälle ausgelöst werden. Auf Anruf versuchten die Tiere den Kopf zum Rufer hinzuwenden. Eine wesentliche Beeinträchtigung des Sensoriums bestand offenbar nicht. Regelmäßig war ein feinschlägiger Nystagmus zu beobachten.

Andere Tiere hatten keine Krämpfe und boten mehr das Bild einer allgemeinen Lähmung. Sie blieben in Seitenlage. Wenn sie gelegentlich versuchten, sich aufzurichten, wurde in ihren Bewegungen deutlich, daß die Lähmungen mehr spastischer Art waren. Bei den meisten von ihnen war die Steife der Glieder und Übererregbarkeit beim Beklopfen unschwer nachzuweisen. Von den mit 20 mg/kg vergifteten Tieren starben zwei bereits nach 7 bzw. 13 Stunden. Die Hunde, die

schon eine Weile ruhig gelegen hatten, starben, als sie aus dem Käfig genommen und ins Laboratorium getragen wurden. Ihr Blut hatte einen sehr hohen Hämiglobingehalt. Die zusätzliche Belastung des Transportes ertrugen sie nicht mehr.

Der weitere Verlauf war unregelmäßig. Während einige Tiere tagelang in Seitenlage waren und Krampfanfälle von wechselnder Häufigkeit und Stärke erlitten, erholten sich andere schnell. Zunächst nahmen sie Bauchlage ein und konnten sich noch nicht wieder auf die Beine stellen. Die Kopfbewegungen waren stark ataktisch. Das wurde besonders deutlich, wenn die Tiere den Kopf in eine bestimmte Richtung, etwa zum Futternapf, bewegen wollten. Von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen fraßen die Tiere nicht in den Tagen nach der Vergiftung, tranken aber große Mengen Wasser, sobald sie den Kopf wieder zum Wassergefäß bewegen konnten.

Wenn die Krampfanfälle auch oft den Eindruck einer besonders schweren Vergiftung erweckten, waren sie offenbar für den weiteren Verlauf der Vergiftung nicht entscheidend mitbestimmend. Zwar hatten die mit 20 mg/kg m-Dinitrobenzol vergifteten Tiere, soweit sie nicht innerhalb 20 Stunden nach der Vergiftung starben, vor dem Tode alle Krämpfe von wechselnder Dauer gehabt, doch waren unter den mit 10 mg/kg vergifteten Tieren solche, die Krämpfe hatten und überlebten und andere, die erst nach 6—10 Tagen starben und bei denen nie ein Krampfanfall beobachtet worden war. Genauere Daten über Eintritt und der Dauer der Krämpfe sowie Eintritt des Todes bei einer Gruppe von Tieren sind aus den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

Die Erholung der Tiere, soweit sie den Allgemeinzustand betrifft, zeigte nur insofern einen losen Zusammenhang mit der Vergiftung als die Tiere mit geringerer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes schneller wiederhergestellt waren als die anderen. So erstreckte sich diese Phase über Tage oder Wochen.

Neben den sinnfälligen Wirkungen verursacht das m-Dinitrobenzol besonders Veränderungen des Blutes, die im einzelnen ausführlicher in ihrer Art, Ausmaß und Verlauf beschrieben werden müssen.

Bei einigen Tieren wurde die Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol nach einer oder zwei Wochen wiederholt (unter den Tieren der Tabelle 1 nur zwei). Hatten sich die Tiere von der ersten Vergiftung gut erholt, so war bei der Wiederholung hinsichtlich der Wirkungen auf das Blut, Auftreten von Krämpfen und Eintritt des Todes kein sicherer Unterschied gegenüber einer ersten Vergiftung festzustellen. Wurde die Vergiftung wiederholt, solange noch Wirkungen der ersten Dosis nachweisbar waren (Anämie, HEINZ-Körper, steifer Gang), traten Krämpfe und Tod offenbar häufiger ein.

2. *Die Veränderungen des Blutes.*

Durch Dosen von 10 oder 20 mg/kg m-Dinitrobenzol wurde die Zusammensetzung des Blutes erheblich verändert. Der Gehalt an roten Zellen und Blutfarbstoff wurde vermindert, an weißen Zellen vermehrt. Die roten Zellen wurden morphologisch verändert durch Bildung von Heinzschen Körperchen, und der Blutfarbstoff zu einem erheblichen Teil zu Hämiglobin und manchmal zu einem geringen Teil zu Verdoglobin oxydiert.

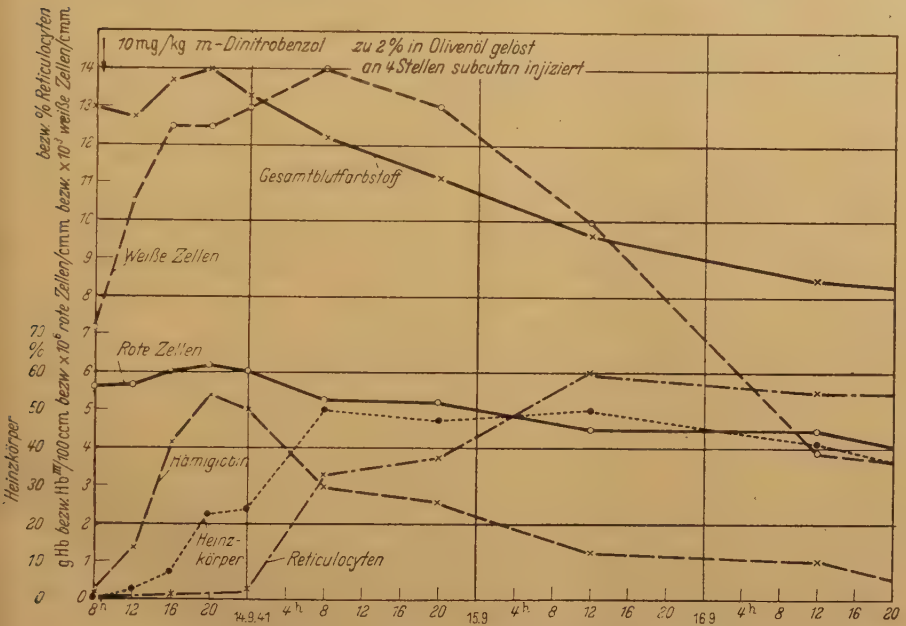


Abb. 1. Änderung der Konzentration von Blutfarbstoff, Hämiglobin, roten Zellen, weißen Zellen, Retikulozyten und Heinz-Körpern im Blute des Hundes nach subkutaner Injektion von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 21 kg. m-Dinitrobenzol zu 2 % in Olivenöl gelöst am 13. 9. 41 8 Uhr an 4 Stellen subkutan injiziert.

Der Ablauf der Veränderung der verschiedenen gemessenen Größen ist durch Wiedergabe je eines Versuches mit 10 und 20 mg/kg m-Dinitrobenzol dargestellt (Abb. 1 und 2). Die charakteristischen Daten anderer Versuche sind ausführlich tabuliert (Tabelle 1, S. 368; Tabelle 2, S. 372).

Zuerst sind die Wirkungen auf den Blutfarbstoff faßbar. Sie erreichen früher als die anderen Wirkungen ihr Maximum und verschwinden auch vor den anderen wieder. Auffallend schnell erfolgte in vielen Versuchen die Vermehrung der weißen Zellen im Blute, während die anderen Veränderungen in ihrer Entwicklungsgeschwindigkeit etwa so folgten: Bildung der Heinz-Körper, Abnahme der roten Zellen, Auftreten von Retikulozyten.

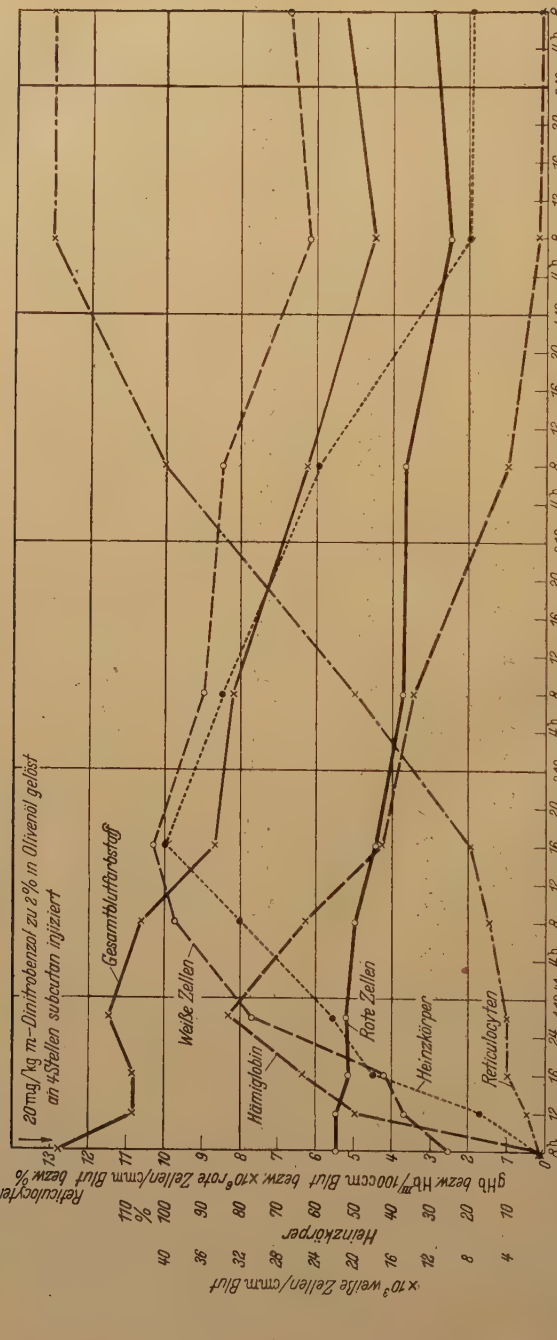


Abb. 2. Änderung der Konzentration von Blutfarbstoff, Hämiglobin, roten Zellen, weißen Zellen, Retikulozyten und HEINZ-Körpern im Blute des Hundes nach subkutaner Injektion von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 18 kg. m-Dinitrobenzol zu 2% in Olivenöl gelöst am 30. 9. 41 8 Uhr an 4 Stellen subkutan injiziert.

a) Der Blutfarbstoff. Die Bildung von Hämiglobin durch m-Dinitrobenzol verlief beim Hunde sehr anhaltend. Über viele Stunden stieg die Hämiglobinkonzentration bis zu ihrem Maximalwert an. Dieser war in seiner Höhe von der Dosis abhängig und betrug nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol 3,0—11,0 g Hämiglobin je 100 ml Blut, im Mittel 6,6 ± 0,9. Die Werte weisen eine starke Streuung auf, $\sigma = 2{,}7$. Nun war der Gesamtblutfarbstoffgehalt des Blutes der Hunde während der Versuche sehr verschieden und es ist leicht aus der Tabelle 1 zu ersehen, daß ein Zusammenhang zwischen dem Hämoglobingehalt vor Versuchsbeginn und der Höhe der maximalen Hämiglobinkonzentration besteht. Nur bei 3 Versuchen, bei denen die Hämoglobinkonzentration nahe dem Mittelwert war, war die Abweichung der Hämiglobinkonzentration vom Mittel nicht gleichsinnig. In den anderen 6 Versuchen waren diese Abweichungen gleichsinnig. Daher ist die Streuung der Wirkungen wesentlich geringer, wenn die Hämiglobinkonzentration zur Konzentration des Gesamtblutfarbstoffs in Beziehung gesetzt, das Hämiglobin also als Anteil des Gesamtblutfarbstoffs ausgedrückt wird. Dann ergibt sich, daß durch 10 mg/kg m-Dinitrobenzol im Mittel ein Anteil von 50 ± 3% Hämiglobin erreicht wurde.

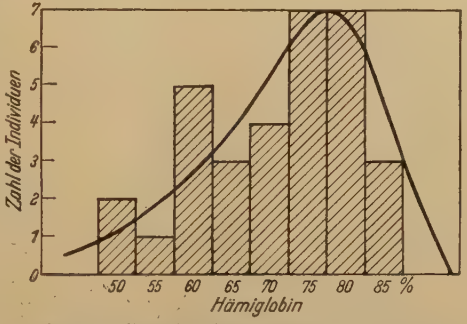


Abb. 3. Häufigkeitsverteilung der durch 20 mg/kg m-Dinitrobenzol bei 32 Hunden erreichten Hämiglobinkonzentration.

Mit 20 mg/kg m-Dinitrobenzol wurden wesentlich höhere Hämiglobinkonzentrationen erreicht, die zwischen 4,0 und 13,8 g/100 ml lagen. Die Streuung war ebenfalls groß, $\sigma = 2{,}1$. Im Mittel war die Hämiglobinkonzentration 10,2 ± 0,4 g/100 ml. Bezogen auf den Gesamtblutfarbstoffgehalt betrug die Hämiglobinkonzentration 71,0 ± 1,7%. Die Streuung war hier auch wieder geringer, nämlich $\sigma = 10$. Für diese Berechnungen lagen 32 Versuche vor. Da in den bisherigen Untersuchungen über Hämiglobinbildung wohl eine so große Zahl von Versuchen mit der gleichen Dosis eines Stoffes an einer Tierart nicht durchgeführt wurden, sei die Streuung der Versuchsergebnisse hier wiedergegeben. In der Abb. 3 ist die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Hämiglobinkonzentrationen bei einer Gruppenbreite von 5% Hämiglobin aufgetragen.

Der Höchstwert der Hämiglobinkonzentration wurde bei Anwendung von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol im Mittel nach 12 Stunden bei Anwendung von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol im Mittel nach 13 Stunden erreicht.

Tabelle 1. *Daten über die Wirkung von m-Dinitro-*

Hund Nr.	Gewicht in kg	Dosis mg/kg	Blutfarbstoff g/100 ml Blut			Blutfarbstoff		Rote Zellen Mill./cmm			Heinz-Körper		Retikulozyten		Weiße Zellen $\cdot 10^{-3}$/cmm		
			vor Injektion	nach 2 Tagen	nach 4 Tagen	Minimum g 100 ml Blut	Zeit nach der Injektion in Tagen	vor Injektion	nach 2 Tagen	nach 4 Tagen	Prozent der roten Zellen	Zeit nach der Injekt. in Std.	Prozent der roten Zellen	Zeit nach der Injekt. in Std.	vor der Injektion	Höchst. Konzentration	Zeit nach der Injekt. in Std.
K 25	22	10	13,0	9,5	8,5	8,0	4	5,0	5,5	5	80	24	3,5	24	17	20	48
K 16	17,5	10	13,5	12	—	12,0	2	5,3	5,3	—	65	48	6	72	12	38	12
K 29	15,5	10	13,5	11,5	—	11,5	2	6,0	5,0	—	50	48	6	24	10	18	24
K 31	10,0	10	10,0	7,5	8,8	7,5	$1^1/_2$	5,6	5,0	5,0	60	24	1	24	10	19	48
K 31	9,5	10	9,0	7,5	7,4	5,5	2	6,0	3,4	3,0	28	24	2	24	10	28	48
K 33	17,0	10	20,0	15	15	14,0	3	7,5	6,2	6,2	20	24	0,5	24	12	14	6
K 33		10	16,2	14	13	13,0	6	6,0	6,0	6,0	35	24	2	48	13	19	24
47	22,5	10	10,3	8		7,0	$2^1/_2$				61	48					
46	20,5	10	14,8	7		5,0	4				75	48					
49	22,5	10	14,9	12,5	11,7	11,0	8				60	36					
K 27		20	12,5	8,5	5	4,5	4	5,0	4,0	3,0	95	36	13	96	10	47	30
K 28		20	12,3	—	—	—	—	5,6	—	—	80	7	2,5	7	14	40	5
K 26		20	16,5	12	9,5	9,3	5	7,5	4,5	3,0	75	24	8,4	48	7	12	24
K 30		20	14,5	—	—	—	—	6,3	—	—					8	16	6
K 31		20	8,0	—	—	—	—	3,6	—	—	100	24			11	47	24

Noch viel langsamer als der Anstieg der Hämiglobinkonzentration erfolgte nach Erreichen des Maximums der Abfall. 24 Stunden nach Injektion von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol betrug der Anteil des Hämiglobins im Mittel noch 27,7 $\pm$ 2,8% und 24 Stunden nach Injektion von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol noch 48,2 $\pm$ 3,1% des Gesamtblutfarbstoffs. Wenn die Reduktion des Hämiglobins nicht beschleunigt wurde, kehrte die Hämiglobinkonzentration nie vor 48 Stunden unter 0,5 g/100 ml zurück. In der Mehrzahl der Versuche dauerte es länger. Für die Dosis von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol ergab sich als Mittel für die Dauer der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration über 0,5 g/100 ml 58 $\pm$ 4 Stunden. Nach einer Dosis von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol hielt die Wirkung bei den Tieren, die sie überlebten, noch länger an, nämlich im Mittel 80 Stunden.

Während die Hämiglobinbildung nach Dosen von 10 und 20 mg/kg ganz regelmäßig eintrat, wurde eine Vermehrung des Verdoglobins im Blute nicht immer beobachtet. Auch in den Versuchen, in denen diese eintrat, war sie nur gering. Konzentrationen über 1 g/100 ml wurden nur vereinzelt nach Dosen von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol

benzol in Dosen von 10 und 20 mg/kg bei Hunden.

Hämiglobin			Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff in Prozent	Verdoglobin		Bilirubin		Krämpfe			Eintritt des Todes	Bemerkungen
Höchste Konzentrat. g/100 ml	Zeit nach der Injekt. in Stunden	Rückkehr zur Norm nach Std.		Höchste Konzentrat. g/100 ml	Zeit nach der Injekt. in Stunden	mg/100 ml	Zeit nach der Injekt. in Stunden	Beginn nach der Injekt. in Stunden	Dauer in Tagen	Stärke		
8,7	8	48	60	0,6	8	2,5	8	9	1/3	+	—	a)
6,0	24	72	45	0,3	—	2,0	21	8	2/3	+++	nach 4 Tagen	b)
7,5	13	86	50	0,4	—	2,1	24	6	5	++	nach 7 Tagen	
3,0	7	48	40	0,4	—	1,2	—	—	—	—	—	
3,2	13	48	45	0,7	7	1,3	—	—	—	—	—	c)
11,0	13	48	55	0,8	24	1,1	—	—	—	—	—	
10,0	8	60	60	0,9	7	0,9	—	5	12	++	nach 17 Tagen	c)
5,7	8	48	60					—	—	—	nach 10 Tagen	
4,5	16	60	30					?	?		—	
4,5	12	60	30									
8,3	12	72	75	0,6	—	1,2	—	12	11	+	—	
9,0	7	—	80	0,8	7	1,3	—	5	bis zum Tode	+++	nach 7 Stunden	d)
9,3	13	72	60	1,2	10	2,1	24	6	8	++	—	
13,5	13	—	85	1,8	8	2,3	8				nach 13 Stunden	
4,0	14	—	60	0,7	8	1,5	—	6		+++	nach 48 Stunden	e)

a) Wegen Staupeerkrankung getötet.

b) 6 Monate mit 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol behandelt. 4 Tage vor der Vergiftung 0,5 cm³/kg Alkohol.

c) Wiederholung des Versuchs nach einer Woche.

d) 3 Wochen mit 0,2 mg/kg/Tage m-Dinitrobenzol vorbehandelt.

e) Vor 3 bzw. 2 Wochen je eine Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol.

gemessen. Die Verdoglobinbildung lief etwa parallel mit der Hämiglobinbildung. Die Erhöhung des Verdoglobingehalts war, wenn sie eintrat, meist nach einem Tage, längstens zwei Tagen wieder verschwunden.

In den ersten Stunden, während die Hämiglobinkonzentration bereits erheblich anstieg, änderte sich meist die Konzentration an Gesamtblutfarbstoff nur unwesentlich. In einigen Versuchen erfolgte sogar zunächst, parallel mit der Konzentration der roten Zellen, ein geringer Anstieg. Wiederholt traten Schwankungen der Konzentration in beiden Richtungen zu Beginn der m-Dinitrobenzol-Wirkung ein. Gegen Ende des ersten Tages und am zweiten Tage nahm dann die Blutfarbstoffkonzentration ab. In den meisten Versuchen erstreckte sich die Abnahme über 2—4 Tage, in einigen aber bis zu 8 Tagen.

Die Verminderung der Blutfarbstoffkonzentration nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol variierte zwischen 1,5 und 9,8 g/100 ml und betrug im Mittel 4,0 $\pm$ 0,3 g/100 ml. Von den Versuchen mit 20 mg/kg m-Dinitrobenzol sind leider nur Daten von 2 Tieren, die die Vergiftung längere Zeit überlebten, erhalten geblieben. Bei einem betrug die Abnahme 8,0, bei dem anderen 7,3 g/100 ml Blut. Das weist in Übereinstimmung mit anderen Versuchen auf eine stärkere Abnahme des Blutfarbstoffs nach der größeren Dosis.

Die Regeneration des verlorenen Blutfarbstoffs erfolgte innerhalb Tagen bis Wochen. Der Ausgleich einer über das Mittel gehenden Abnahme des Blutfarbstoffs dauerte 2—4 Wochen. Kleinere Veränderungen wurden meist schnell ausgeglichen.

b) Die roten Zellen. Die Abnahme der Konzentration der roten Zellen im Blute und ihr Wiederanstieg während der Reparation lief in engen Grenzen den entsprechenden Veränderungen des Blutfarbstoffs parallel, so daß eine genauere Beschreibung nicht notwendig ist.

Die Mehrzahl der roten Zellen eines Tieres, die zirkulierten, wurden durch das m-Dinitrobenzol geschädigt; an ihnen entstanden HEINZsche Körperchen. Diese Wirkung war in den meisten Versuchen schon wenige Stunden nach der Injektion des m-Dinitrobenzols feststellbar und folgte in ihrer Entwicklung zum Maximum dicht hinter dem Hämiglobin. Die HEINZ-Körper, die an normalen roten Zellen des Hundes nicht gefunden werden, traten im Beginn der Wirkung nur vereinzelt auf und waren im Laufe von 24—48 Stunden an immer mehr roten Zellen feststellbar. Zunächst nur eben wahrnehmbare Pünktchen wurden sie im Laufe der Zeit größer. Sie traten auch als verzweigte Gebilde oder als multiple Körperchen an der gleichen Zelle auf. Von Retikulocyten unterscheiden sich solche Zellen durch die gröbere Struktur der angefärbten Gebilde. Der Anteil der roten Zellen, der eine HEINZ-Körperbildung erfährt, war von der m-Dinitrobenzol-Dosis abhängig. Nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol wurden HEINZ-Körper im Mittel bei 55% der roten Zellen beobachtet. Nach Dosen von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol wiesen 90—100% der Zellen HEINZ-Körper auf. Die maximale Menge von HEINZ-Körpern wurde bei 10 mg/kg m-Dinitrobenzol im Mittel nach 36 Stunden erreicht, bei 20 mg/kg schon nach 24 Stunden.

Im Laufe einer Woche pflegten die HEINZ-Körper aus dem Blut zu verschwinden oder bis auf wenige Prozent abzunehmen. Doch lief der Prozeß nicht immer so streng der Abnahme des Hämoglobins parallel wie in dem Versuch der Abb. 2. Ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von HEINZ-Körpern und der Stärke der Anämie war nicht vorhanden.

Die Schädigung der roten Zellen durch das m-Dinitrobenzol verminderte auch ihre Resistenz gegen Verminderung des osmotischen Drucks. In Abb. 4 sind die Messungen der osmotischen Resistenz an den roten Zellen eines Hundes vor und 13 Stunden nach Injektion von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol wiedergegeben. Die Hämolysekurve, die die Beziehungen zwischen Kochsalz-Konzentration und Grad der Hämolyse wiedergibt, ist nach Eintritt der m-Dinitrobenzol-Wirkung in den Bereich höherer Kochsalzkonzentrationen verlagert. Die Zellen waren also gegen Verminderung des äußeren osmotischen Druckes empfindlicher geworden. Bei anderen Versuchen mit 20 mg/kg m-Dinitro-

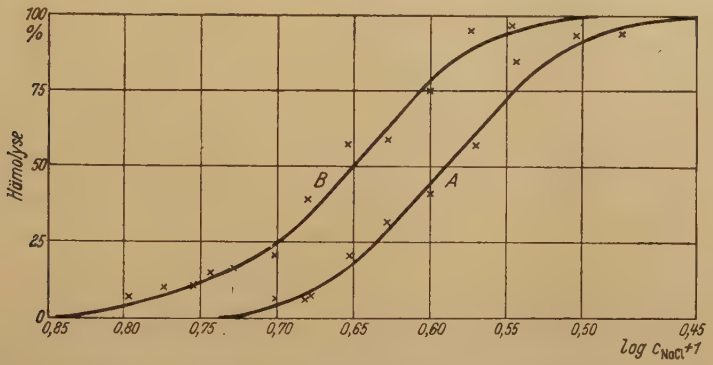


Abb. 4. Osmotische Resistenz der roten Zellen eines Hundes vor (*A*) und nach (*B*) der Einwirkung von m-Dinitrobenzol. Unmittelbar nach Entnahme der Zellen *A* subkutane Injektion von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol. Zellen *B* 13 Stunden später entnommen. Als Abszisse ist log *c* NaCl + 1 gewählt, wo *c* NaCl die Kochsalzkonzentration in g/100 ml Lösung angibt, in der die Zellen suspendiert wurden.

benzol entsprach die Änderung der osmotischen Resistenz auch etwa den in Abb. 4 wiedergegebenen Daten. Nach 10—20 Stunden erreichte die osmotische Resistenz ihr Minimum und kehrte schon nach 1 bis 2 Tagen wieder in die Nähe des ursprünglichen Wertes zurück. Nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol war die Änderung der osmotischen Resistenz nur gering und kam in einigen Versuchen kaum aus dem Streuungsbereich heraus.

Am zweiten Tage nach der Vergiftung waren im Blut der meisten Tiere schon vermehrt Retikulozyten zu finden. Diese Zahl pflegte noch am 3. oder 4. Tage zuzunehmen, erreichte aber nie auffällig große Werte. Ein Anteil von 13% der roten Zellen wie im Versuch der Abb. 2 war ungewöhnlich. Bei der Betrachtung dieser Abbildung ist zu berücksichtigen, daß für die Retikulozyten der 10fache Ordinatenmaßstab gewählt wurde wie für die Heinz-Körper. Die Vermehrung der Retikulozyten hielt längstens bis zur Reparation der Anämie an, meist kehrten sie aber schon vorher auf normale Werte zurück. Fast in allen

Tabelle 2. *Änderung des Gehalts an Blutfarbstoff, Hämiglobin und* HEINZ-*Körpern im Blute von Hunden nach subkutaner Injektion von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol.*

Hund Nr.	Blutfarbstoffkonzentration g/100 ml Blut		Hämiglobin			Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff in %	HEINZ-Körper		Behandlungszeit und -art
	vor der Injektion	nach 2 Tagen	Höchstkonzentration g/100 ml	Zeit nach Injektion in Stunden	Rückkehr zur Norm nach Std.		Prozent der roten Zellen	Zeit nach Injektion in Stunden	
P 2	15	13	10,0	10	> 60	75	100	36	3 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 3	18	12	10,7	14		75	100	24	4 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 4	15,3		12,3	5		80			9 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 5	15,5	13	8,5	10	72	55	100	24	5 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 6	14,5	10	10,5	15	96	70	95	24	3 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 7	14,0	13,5	9,3	15	72	75	100	24	3 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 9	19	18	13,8	15	60	75	100	24	3 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 10	17,5	14	8,8	15	72	65	100	24	3 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 16	17,0	11,5	6,0	18	96	50	100	24	7 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 17	13,2	8,0	10,0	14	72	75	100	24	7 Tage mit 3g $Na_2S_2O_3$
P 8	19,0	18,0	12,0	13	80	65	100	24	
P 11	15,5	10,3	11,5	24	96	85	100	24	
P 12	17,5	16,0	11,0			70			
P 13	17,0	14,7	10,3	24	72	60	100	24	
P 14	19,0	14,5	10,5	20	72	60	100	24	
P 18	17,2	17,0	13,5	18		80	100	24	
P 19	20,5	12,1	10,3	19		75	100	24	
P 21	15,0		10,3	12		85			
P 22	15,0		9,8	12		80			
P 23	16,4		13,0	20		80			
P 24	15,0		9,6	10		65			
P 25	12,6		10,2	14		80			
P 26	16,3		8,1	14		50			
P 27	13,2		9,3	14		70			
P 28	14,5		8,5	13		60			
P 34	21,6		13,0	6		70			
P 35	16,7		12,0	9		80			

Versuchen wurden 1—2 Tage nach der Vergiftung im peripheren Blute auch Normoblasten gefunden.

c) Die weißen Zellen. Es ist schon bemerkt worden, daß bei jeder akuten Vergiftung mit m-Dinitrobenzol eine Zunahme der weißen Zellen im strömenden Blute eintrat. Die Reaktion war in ihrem Ausmaß sehr schwankend. Während bei einigen Tieren nur Vermehrungen auf 12—14000 Zellen/μl eintraten, stiegen sie in anderen Fällen auf 47000. Ausnahmslos erfolgte die Vermehrung der weißen Zellen verhältnismäßig schnell. In der Mehrzahl der Versuche kehrte ihre Zahl schon in wenigen Tagen wieder zur Norm zurück. Bei zwei Tieren, je eins mit 10 und 20 mg/kg m-Dinitrobenzol vergiftet, folgte einem kurzen Anstieg der Zahl der weißen Zellen ein Abfall erheblich unter den Ausgangswert, nämlich auf 4000 bzw. 4500 Zellen/μl Blut gegenüber

Ausgangswerten von 7000 bzw. 12000 (Abb. 1). An der Zunahme beteiligten sich meist die polymorphkernigen Zellen etwas stärker als die Lymphocyten. Stabkernige und Jugendliche nahmen ein wenig zu. Im Blute zweier Tiere waren auch die Eosinophilen auf 4—6% vermehrt. Einige Differentialblutbilder vom Versuch mit dem Hunde 27 sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

d) Weitere Veränderungen im Blute. Bestimmungen des Bilirubingehalts des Serums ergab nur bei einigen Tieren nach der m-Dinitrobenzol-Vergiftung eine einwandfreie Erhöhung. Der Bilirubingehalt, der vorher um 1 mg/100 ml betrug, war dann innerhalb 24 Stunden

Tabelle 3. *Differentialblutbilder nach Vergiftung des Hundes K 27 mit 20 mg/kg Dinitrobenzol.*

Datum	Je 100 weiße Zellen						
	Eosinophile	Basophile	Jugendliche	Stabkernige	Segmentkernige	Lymphozyten	Monozyten
19. 9. 41	—	—	—	1	74	24	1
29. 9. 41	—	—	—	2	70	28	—
30. 9. 41	8 Uhr 20 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan						
	16 Uhr 3	—	—	3	76	18	—
1. 10. 41	1	—	2	6	82	6	3
2. 10. 41	—	—	1	7	87	4	1
3. 10. 41	—	—	—	3	85	12	—
4. 10. 41	1	—	—	2	77	20	—
5. 10. 41	—	—	—	2	78	19	1

auf 2 mg/100 ml angestiegen. Nach 1—2 weiteren Tagen war die Bilirubinkonzentration wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt.

Wir haben Messungen der Blutgerinnung nicht durchgeführt. Es mag aber erwähnt werden, daß die Gerinnung des Blutes nach der m-Dinitrobenzol-Einwirkung beschleunigt zu sein schien. Jedenfalls waren Störungen durch vorzeitige Gerinnung zu den Zeiten des höchsten Hämiglobingehalts häufiger als sonst.

3. Harn.

Im Harn wurden nach der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol Zunahmen des Gehalts an Protein, Zucker und Bilirubin nicht beobachtet. Bei einigen Tieren trat vorübergehend eine Vermehrung der Urobilinogenausscheidung ein. Mehrere Tiere schieden am ersten und zweiten Tage nach der Vergiftung vermehrt Kreatin aus.

4. Pathologisch-anatomische Veränderungen.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen nach einer einmaligen akuten Vergiftung mit m-Dinitrobenzol waren nicht sehr erheblich. Bei den Tieren, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Injektion

starben, fiel bei der Sektion neben der Braunfärbung des Blutes die starke Blutfüllung der Hohlvenen und der Leber auf, das Herz war weit und schlaff. Tiere, die erst mehrere Tage nach der Vergiftung gestorben waren, boten bei der Sektion keine makroskopisch sicher erkennbaren Veränderungen abgesehen von Grau- oder Schwarzfärbung der Oberfläche von Leber, Milz und Nieren, wo diese Organe den Darm berührten.

Die histologische Untersuchung wies jedoch einige Veränderungen nach. Diese betrafen im wesentlichen Leber und Milz. In der Niere wurde Verfettung der gewundenen Harnkanälchen beobachtet aber nicht in einem Maße, das die auch bei normalen Tieren zu beobachtenden Fetteinlagerungen erheblich überstieg. In der Leber wiesen sowohl die Parenchymzellen wie die Endothelien Schädigungen auf. Neben diffusen feintropfigen Verfettungen und Vakuolenbildungen wurden bei einem Tier auch beginnende zentrale Läppchennekrosen beobachtet. Häufiger wurden Dissoziation der Zellen, trübe Schwellung und veränderte Kernfärbbarkeit besonders in den Zentren der Läppchen gefunden. Die KUPFFERschen Sternzellen enthielten große Mengen Hämosiderin und waren vollgestopft mit Stromata von roten Zellen, an denen die HEINZ-Körper noch erkennbar waren. Die Kapillarendothelien waren geschwollen und zum Teil abgelöst. Die Gallenkapillaren waren oft erweitert. Die Endothelien in der Milz waren ebenfalls übervoll von Hämosiderin und besetzt mit Stromata von roten Zellen.

5. Besprechung.

Das m-Dinitrobenzol hat mehrere Wirkungen, die vielleicht von der gleichen Substanz ausgelöst werden, aber sicher nicht über die Auslösung durch ein Pharmakon hinaus miteinander verknüpft sind. Weder aus dem Ablauf noch aus sonstigen pharmakologischen oder pathologischen Erfahrungen ist ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Hämiglobinbildung, der Anämie, den Schädigungen des Zentralnervensystems und der Leber anzunehmen.

Es ist übrigens durchaus nicht sicher, daß die verschiedenen Wirkungen durch den gleichen Stoff bedingt werden. Das m-Dinitrobenzol passiert den Organismus nicht unverändert. Eine Wirkung, die Bildung von Hämiglobin, ist ganz sicher nicht auf das m-Dinitrobenzol selbst, sondern auf ein Reduktionsprodukt zurückzuführen. Wie weit das auch auf die anderen Wirkungen zutrifft, ist nicht zu entscheiden. Jedoch treten auch Wirkungen wie die HEINZ-Körperbildung und die Schädigung des Zentralnervensystems erst nach Stunden deutlich hervor. Diese Verzögerung kann nicht ausschließlich durch langsame Resorption bedingt sein, sondern ist wahrscheinlich auf Umsetzungen des m-Dinitrobenzols zurückzuführen.

Die Toxizität des m-Dinitrobenzols ist für Hunde etwas geringer als für Katzen, aber größer als für Meerschweinchen und Ratten.

Ist die Wirkung tödlich, so ist der Eintritt des Todes wahrscheinlich nicht immer durch die gleichen Wirkungen bedingt. Beim Tode mehrere Tage nach der Verabreichung von m-Dinitrobenzol ist sicher eine Schädigung des Zentralnervensystems als Ursache anzunehmen. Dosen von 20 mg/kg m-Dinitrobenzol töteten mehrere Tiere zu der Zeit als die Hämiglobinkonzentration im Blute am höchsten war. Wahrscheinlich war in diesen Fällen die Anoxie an der tödlichen Wirkung sehr stark beteiligt. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß der Frühtod der Tiere verhindert werden konnte, wenn die Hämiglobinkonzentration durch Anwendung von Farbstoffen gesenkt wurde [21].

Die nervösen Störungen können wir noch nicht lokalisieren und auch nicht in ihrem Mechanismus näher verstehen. Ihre spastische Art weist jedoch darauf hin, daß nicht die peripheren Neuronen befallen sind. Sie sind beim Hunde weit stärker ausgeprägt als bei anderen Tieren, bei denen sie zum Teil, wie bei der Katze, ganz vermißt werden. Beim m-Dinitrobenzol sind die Wirkungen auf das Zentralnervensystem wesentlich stärker als bei anderen Nitrobenzolen, denen sie jedoch wie dem Trinitrotoluol nicht ganz fehlen. Auffällig ist die lange Dauer dieser Wirkung, die in einigen Versuchen mehrere Tage anhielt. Im Zentralnervensystem muß eine nur langsam wieder reparable Schädigung gesetzt worden sein. Es ist nicht anzunehmen, daß der wirksame Stoff länger als eine Woche in wirksamer Konzentration im Zentralnervensystem vorhanden ist, wenn auch der Ablauf der Hämiglobinbildung darauf hinweist, daß der wirksame Stoff länger als 2 Tage im Hunde in noch wirksamer Konzentration vorhanden ist.

Die Leberschädigungen sind gering. Wir haben ihnen eine besondere Untersuchung gewidmet, die später mitgeteilt wird.

Die Anämie ist sicher weniger durch eine Schädigung des Knochenmarks als durch eine Schädigung der roten Zellen bedingt, die schnelleres Abfangen der roten Zellen zum Abbau bewirkt. Dafür spricht die in einigen Versuchen schnell erfolgende Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration, die Phagozytose der roten Zellen in den Retikuloendothelien, deren Überladung mit Eisen. Auch die Zunahme der Zellen mit Heinz-Körpern nach einer Adrenalininjektion (Milzkontraktion) weist darauf hin, daß diese Zellen in der Milz — wahrscheinlich zum Abbau — gesammelt werden. Die Reaktionsbereitschaft des Knochenmarks erscheint zunächst nicht wesentlich gestört, wie die Leukozytose und das Auftreten von Retikulozyten zeigt. Beide Reaktionen, Leukozytose und Retikulozytose, erfolgen sogar sehr schnell. Sie beginnen meist bevor eine nennenswerte Anämie eingetreten ist, so daß das Knochenmark ganz sicher fähig ist, einen Reiz,

den die Blutzerfallsprodukte oder das m-Dinitrobenzol selbst bilden, zu beantworten. Jedoch ist die Zunahme der Retikulozyten meist gering und in mehreren Versuchen erfolgte die Heilung der Anämie nur langsam, so daß es zweifelhaft erscheint, ob die Leistungsfähigkeit des Knochenmarks voll erhalten blieb. Untersuchungen über den Eisenstoffwechsel bei der m-Dinitrobenzol-Vergiftung, die später mitgeteilt werden, weisen ebenfalls auf eine Entstehung der Anämie durch vermehrten Abbau roter Zellen, lassen aber die Möglichkeit einer Schädigung des Knochenmarks ebenfalls offen. In Versuchen, in denen zunächst geringe Zunahmen der Blutfarbstoffkonzentration und der roten Zellen eintraten, waren wahrscheinlich Wasserbewegungen aus dem Blut ins Gewebe die Ursache. Auch die wiederholt beobachteten stärkeren Schwankungen der Farbstoffkonzentration nach beiden Richtungen im Beginn der m-Dinitrobenzol-Wirkung sind wohl durch Wasserbewegungen zu erklären.

Die Schädigung der roten Zellen ist morphologisch durch den Nachweis der HEINZ-Körper feststellbar. Mit größter Wahrscheinlichkeit sind die HEINZ-Körper Denaturierungsprodukte. Daß in Zellen mit HEINZ-Körpern Denaturierungsprozesse abgelaufen sind, war durch die Auffindung von denaturiertem Hämoglobin und denaturiertem Verdoglobin nachzuweisen (KIESE und SEIPELT[15]). Elektronenoptische Aufnahmen der Stromata roter Zellen mit HEINZ-Körpern zeigen ebenfalls, daß in den HEINZ-Körpern vermehrt in Wasser nicht lösliche Substanz vorhanden ist (JUNG[16]). Wahrscheinlich sind Denaturierungsprozesse in der Membran der roten Zellen auch unter physiologischen Bedingungen die Veranlassung zum Abfangen der roten Zellen aus dem strömenden Blut. Daß das in vermehrtem Maße erfolgen wird, wenn künstlich Denaturierungen gesetzt werden, ist leicht einzusehen. Bei den HEINZ-Körpern handelt es sich übrigens nicht um grundsätzlich „unphysiologische" Gebilde, sondern um einen Reaktionsweg, der auch physiologisch beschritten wird, wie die Anwesenheit von HEINZ-Körpern an roten Zellen gesunder Katzen zeigt, die nicht unter der Wirkung HEINZ-Körper bildender Gifte stehen. Es sind sehr reaktionsfähige Stoffe erforderlich, um in den geringen Konzentrationen, die im Blute auftreten, die Denaturierung zu beschleunigen. Diesem Umstand ist es zuzuschreiben, daß so häufig mit der Bildung von HEINZ-Körpern auch Veränderungen des Blutfarbstoffs eintreten, was für die Wirkung des m-Dinitrobenzols auch zutrifft. Dieses bildet sowohl Hämiglobin wie Verdoglobin. Wie bei den meisten Stoffen, die in vivo Verdoglobin zu bilden vermögen, ist auch beim m-Dinitrobenzol die Verdoglobinbildung nicht regelmäßig. Daß keine ursächlichen Beziehungen

[15] KIESE, M. u. L. SEIPELT: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 648 (1943). — [16] JUNG, F.: Naturw. **30**, 472 (1942).

zwischen dem Auftreten von HEINZ-Körpern und den Veränderungen des Blutfarbstoffs bestehen, ist ausführlich dargestellt worden (HEUBNER[17, 18]).

Es wurde schon erwähnt, daß für die Bildung des Hämiglobins nicht das m-Dinitrobenzol selbst in Frage kommt, sondern ein Reduktionsprodukt. Muskelbrei vermag m-Dinitrobenzol zu Nitrophenylhydroxylamin zu reduzieren (LIPSCHITZ[19]). Innerhalb des ganzen Organismus läuft die Reduktion sicher auch ab. Sie scheint überhaupt neben der Geschwindigkeit der Resorption des m-Dinitrobenzols für den Ablauf der Wirkung — wenigstens soweit es sich um die Hämiglobinbildung handelt — sehr stark mitbestimmend zu sein. Das Nitrophenylhydroxylamin reagiert ebenso schnell mit Hämoglobin wie Phenylhydroxylamin, hält sich aber länger im Organismus (HERKEN[20]). Die Bildung der HEINZ-Körper und die Verminderung des Blutfarbstoffs und der roten Zellen waren von der Dosis des m-Dinitrobenzols abhängig, doch ist der Ablauf dieser Wirkung noch nicht genauer zu übersehen. Der anderen Wirkungen oft erst nachfolgende Anstieg der Zahl der HEINZ-Körper im Blute braucht nicht durch eine entsprechend langsamere Bildung bedingt zu sein. Geschädigte rote Zellen werden aus dem strömenden Blute abgefangen. Zunächst ist das Retikuloendothel noch sehr aufnahmefähig und fängt die ersten geschädigten Zellen ab. Erst später, wenn die Kapazität des Retikuloendothels allmählich erschöpft wird, bleiben vermehrt rote Zellen mit HEINZ-Körpern im Blute zurück, so daß es zu einem erheblichen Anstieg des Prozentsatzes der roten Zellen mit HEINZ-Körpern kommen kann. Sobald die Neubildung von HEINZ-Körpern geringer wird, nimmt ihre Konzentration im Blute wieder ab.

Tiefere Einblicke sind jedoch in den Ablauf der Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin möglich und erlauben eine ausführlichere Erörterung dieser Wirkung.

Die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung wurde in unseren Versuchen durch 2 Dosen mit einer größeren Zahl von Tieren festgelegt. Mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol wurde die Hämiglobinkonzentration im Blute auf 50 $\pm$ 3% des Blutfarbstoffs und mit 20 mg/kg auf 71,0 $\pm$ 1,7% erhöht. Die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung war also nicht gradlinig. Sie ist in Abb. 5 wiedergegeben. Zum Vergleich sind die Werte eingetragen, die KUNZ[9] beim Meerschweinchen gemessen hat. Beide Kurven verlaufen so, daß durch Verdoppelung der Dosis die Hämoglobinkonzentration nur um die Hälfte zunimmt. v. ISSEKUTZ[8]

[17] HEUBNER, W.: Klin. Wschr. **1942**, 52. — [18] HEUBNER, W.: Fol. haemat. (D) **67**, 323 (1943). — [19] LIPSCHITZ, W.: Z. physiol. Chem. **109**, 189 (1920). — Pflügers Arch. **183**, 275 (1920); **205**, 354 (1924). — [20] HERKEN, H: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 70 (1943).

Messungen an der Katze sind zum Vergleich weniger geeignet, da sie die Hämiglobinkonzentration 6 Stunden nach Beginn der m-Dinitrobenzolwirkung, also noch beträchtlich vom Maximum entfernt, angeben. Aber auch hier, wie bei allen anderen Stoffen, die v. ISSEKUTZ untersuchte, war die Abhängigkeit der Hämiglobinkonzentration von der Dosis ähnlich der für m-Dinitrobenzol beim Hunde gefundenen, wenn jeweils der Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff in Beziehung zur Dosis gesetzt wird. Ein solcher Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung ist zu erwarten. Denn die Reaktionsgeschwindigkeit der Hämiglobinbildung ist nicht nur von der Konzentration des Hämiglobin bildenden Stoffs abhängig, sondern auch von der Konzentration an Hämoglobin, die in dem Maße abnimmt wie Hämoglobin zu Hämiglobin oxydiert wird.

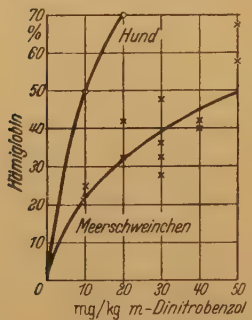


Abb. 5.
Maximale Hämiglobinkonzentration bei Hund und Meerschweinchen in Abhängigkeit von der Dosis m-Dinitrobenzol.

Notwendig erscheint ein Hinweis auf die Variation der bei Anwendung der gleichen Dosis erreichten Hämiglobinkonzentrationen. Die Streuung ist recht groß. Die Verteilung der in Abb. 3 verwerteten 32 Ergebnisse ist nicht normal. Trotz der noch verhältnismäßig geringen Zahl von Werten ist es wahrscheinlich, daß die Verteilung wirklich eine beträchtliche Schiefe hat. Denn der Mittelwert und noch mehr der häufigste Wert liegen bereits dicht an der oberen Grenze der überhaupt möglichen Werte. Hämiglobinkonzentrationen von 90% dürften kaum vorkommen und solche von 95% sind praktisch auszuschließen. Eine Schiefe der Verteilung, wenn auch geringeren Ausmaßes, wird wahrscheinlich auch durch die Form der Dosiswirkungskurve bedingt.

In Anbetracht der großen Streuung, die auch in den in Abb. 5 wiedergegebenen Werten von KUNZ[9] erkennbar ist, erscheint es nicht zulässig auf Grund von Ergebnissen mit wenigen oder gar nur einem Versuch je Dosis Unstetigkeiten in der Dosiswirkungskurve Hämiglobin bildender Stoffe anzunehmen, wie es wiederholt geschah[21, 8, 10]. Die Unregelmäßigkeiten, die v. BREDOW und JUNG[10] in der Dosiswirkungskurve des 2,6-Dinitrotoluols beobachteten, bedürfen jedoch noch weiterer Klärung. Wenn man den Hämiglobingehalt als Anteil des Gesamtblutfarbstoffs in Abhängigkeit von der Dosis aufträgt, erscheint die Vermutung einer zweifachen Wirkungsweise sehr naheliegend.

Es ist korrekt, die maximale Erhöhung der Hämiglobinkonzentration als Maß einer Wirkung zu betrachten und sie quantitativ auszuwerten.

[21] SCHWEDTKE, G.: Arch. exper. Path. (D.) 188, 121 (1938).

Sie ist jedoch kein geeignetes Maß für den ganzen Umfang der Hämiglobinbildung, und sie gibt in keinem Fall eine Anschauung von der Umsetzung, die in den roten Zellen bei einer Vergiftung mit Hämiglobinbildung abläuft. Im Organismus wird nämlich das gebildete Hämiglobin wieder zu Hämoglobin reduziert[22], und zwar schon während seine Konzentration noch im Ansteigen ist. Daß die Hämiglobinreduktion auch im Blute von Hunden, die mit m-Dinitrobenzol vergiftet waren, abläuft, zeigten Versuche in vitro und wird auch durch die gute katalytische Wirksamkeit von Farbstoffen bewiesen[24]. Durch die fortlaufende Reduktion wird die maximal erreichte Hämiglobinkonzentration um den inzwischen schon reduzierten Anteil geringer. Ferner wird auch nach Überschreiten des Gipfels der Hämiglobinkonzentration noch weiter Hämiglobin gebildet, wenn auch nur mehr mit einer Geschwindigkeit, die geringer ist als die Geschwindigkeit der Reduktion des Hämiglobins. Erfolgt die Hämiglobinbildung schnell und verschwindet der hämiglobinbildende Stoff auch wieder schnell, so gehen maximale Hämiglobinkonzentration und gebildete Menge Hämiglobin vielleicht fast parallel. Bei langsam reagierenden Stoffen sind aber je nach der Dauer der Reaktion sehr große Abweichungen möglich, denn die Hämiglobinmengen, die in der Stunde reduziert werden können, sind recht beträchtlich. Das Blut des Hundes mit 5 Millionen roten Zellen im Kubikmillimeter reduziert bei höheren Hämiglobinkonzentrationen in der Stunde etwa 3,2 g Hämiglobin je 100 ml Blut[23, 24]. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion von der Hämiglobinkonzentration ist an anderer Stelle[25] genau dargestellt. Während des 12stündigen Anstiegs der Hämiglobinkonzentration werden fast 40 g Hämiglobin je 100 ml Blut reduziert, die zwar im Werte der maximalen Hämiglobinkonzentration nicht mehr erscheinen, aber wirklich gebildet wurden. Die tatsächlich noch vorhandenen Hämiglobinmengen treten also schon zu der Zeit, wo die Hämiglobinkonzentration ihren höchsten Wert erreicht hat, der Menge nach ganz in den Hintergrund gegenüber den bereits wieder reduzierten. Die Gesamtmenge Hämiglobin, die während der ganzen Wirkungsdauer des m-Dinitrobenzols gebildet wird, läßt sich aus der Geschwindigkeit der Hämiglobinreduktion und der Dauer der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration errechnen. Die genauere Berechnung des Wertes erfordert die Berücksichtigung der Abhängigkeit der Hämiglobinreduktion von der Hämiglobinkonzentration, der Änderung der Konzentration der roten Zellen und der Elimination hämiglobinhaltiger roter Zellen infolge Heizkörperbildung[25]. In guter Annäherung

[22] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1946**, 81. — [23] Kiese, M. u. B. Weiss: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 493 (1943). — [24] Kiese, M.: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 289 (1946). — [25] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947**, 453.

kann man bei stärkeren Wirkungen, wie sie hier interessieren, die gesamte Hämiglobinmenge errechnen, wenn man für die Zeit b, in der die Hämiglobinkonzentration über 1 g/100 ml erhöht ist, eine konstante mittlere Reduktionsgeschwindigkeit a annimmt. Die gesamte Hämiglobinmenge ist dann $Wg = a \cdot b$. Für die Dosis von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol ist dann $Wg = 3{,}2 \cdot 50 = 160$ g Hämiglobin/100 ml Blut und für 20 mg/kg m-Dinitrobenzol $Wg = 3{,}2 \times 70 = 224$ g.

Die Zunahme der Wirkung bei Erhöhung der Dosis von 10 mg/kg auf 20 mg/kg ist also gemessen am Gesamtumsatz der Hämiglobinbildung noch geringer (40%) als gemessen an der Hämiglobinkonzentration. Es ist leicht zu übersehen, daß die größere Hämiglobinbildung durch die Dosis von 20 mg/kg fast ausschließlich der längeren Wirkungsdauer zuzuschreiben ist. Daß durch die doppelte Dosis m-Dinitrobenzol nicht die doppelte Menge Hämiglobin gebildet wird, ist durch die Kinetik der Hämiglobinbildung bedingt. Mit der Zunahme der Hämiglobinkonzentration nimmt die Hämoglobinkonzentration ab. Außerdem ist nach Injektion der doppelten Menge m-Dinitrobenzol der Hämiglobinbildner nicht in doppelter Konzentration vorhanden, sondern in geringerer.

Mit Rücksicht auf gewisse theoretische Vorstellungen von der Wirkungsweise Hämiglobin bildender Stoffe hat der Gesamtumsatz an Hämiglobin, den ein solcher Stoff leistet, interessiert[6]. Bisher wurde dessen Berechnung lediglich die maximale Hämiglobinkonzentration zugrunde gelegt. Es war freilich bekannt, daß die gebildete Hämiglobinmenge infolge der dauernden Reduktion des Hämiglobins größer ist und die errechneten Werte nur Minimalwerte sein können. Aus den vorstehenden Überlegungen wird klar, daß in den meisten Fällen der wirkliche Umsatz ein Vielfaches dieses Wertes beträgt.

In die Berechnungen des von einem Mol eines Stoffes in vivo gebildeten Hämiglobins geht eine erhebliche Unsicherheit ein durch die Schätzung der Konzentration des Hämiglobin bildenden Stoffes im Blute. Immerhin konnte in vielen Fällen die Frage entschieden werden, ob ein Stoff im stöchiometrischen Verhältnis oder in katalytischer Reaktion Hämiglobin bildet. Im 2. Falle läßt sich auf Grund der jetzt möglichen genaueren Bestimmung des Hämiglobinumsatzes wenigstens die Größenordnung des Umsatzes für jede katalytische Molekel ungefähr angeben.

Nehmen wir an, daß sich das m-Dinitrobenzol, bzw. der daraus entstehende eigentliche Hämiglobin bildende Stoff im Organismus gleichmäßig verteile, dann wäre nach einer Dosis von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in 100 ml Blut 1 mg m-Dinitrobenzol enthalten, das sind $6 \cdot 10^{-6}$ Mole. Diese setzen während der gesamten Wirkzeit 160 g Hämoglobin zu Hämiglobin um, das sind $0{,}94 \cdot 10^{-2}$ Äquivalente

Hämiglobin. Demnach würde 1 Mol m-Dinitrobenzol etwa 1600 Äquivalente Hämiglobin bilden. Es kommt wahrscheinlich nicht jede m-Dinitrobenzol-Molekel im Blute zur Reaktion. Andererseits könnten nach Verbrauch von Katalysator-Molekeln neue aus dem Gewebe nachgeliefert werden. Auf jeden Fall handelt es sich bei der Hämiglobinbildung durch m-Dinitrobenzol um eine katalytische Wirkung, was auch Heubner und Lo Sing[7] und von Issekutz[8] aus ihren Untersuchungen schließen konnten.

Es erscheint interessant, die Hämoglobinbildung durch m-Dinitrobenzol auch bei einem Tier mit schneller Reduktion des Hämiglobins zu berechnen. Für das Meerschweinchen ist $a = 14$ g/100 ml/Stunde, ferner für eine Dosis von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol, b wahrscheinlich etwa 8 Stunden[9].

Daraus ergibt sich eine Hämiglobinbildung von 112 g/100 ml. Das ist wesentlich weniger als die Menge Hämiglobin, die 10 mg/kg m-Dinitrobenzol beim Hunde bilden. Dementsprechend ist auch der Umsatz an Hämoglobin zu Hämiglobin im Meerschweinchen geringer, nämlich 400 Äquivalent Hämiglobin je Mol m-Dinitrobenzol.

Im Meerschweinchen fällt der Katalysator für die Hämiglobinbildung — allerdings nach intraperitonealer Injektion — viel schneller an als beim Hunde. Nach 10 mg/kg m-Dinitrobenzol ist die anfängliche Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung 20 g Hämiglobin/100 ml Blut/Stunde gegenüber 3,7 g/100 ml/Stunde beim Hunde. Somit ist anzunehmen, daß in der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Hämiglobinkonzentration die Konzentration des Katalysators im Meerschweinchen 5—6mal so groß wie im Hunde, ist. Jedoch ist der Katalysator im Meerschweinchen erheblich unbeständiger und wird schneller durch Ausscheidung oder Nebenreaktionen unwirksam. Die vorstehenden Berechnungen der Größe der Hämiglobinbildung setzen voraus, daß die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration im Blute durch Beschleunigung der Hämiglobinbildung und nicht durch Hemmung der Hämiglobinreduktion erfolgt. Bisher sind noch keine Stoffe bekannt geworden, die die Hämiglobinreduktion spezifisch hemmen und darum in vivo als „Hämiglobinbildner" erscheinen. Die Zerstörung der roten Zellen stört zwar auch die Hämiglobinreduktion, aber geschädigte Zellen verschwinden schnell aus dem Blute.

Die Kenntnis der von einem Gift gebildeten Menge Hämiglobin und der erreichten Hämiglobinkonzentration im Blute nötigt noch zu einer weiteren Klärung des Begriffs der Wirkungsstärke. Phenylhydroxylamin bewirkt zwar einen höheren Anstieg der Hämiglobinkonzentration im Blute, aber m-Dinitrobenzol bildet mehr Hämiglobin. Bisher sprach man von schwachen und starken Hämiglobinbildnern

und meinte mit diesen die Stoffe, die die höhere Hämiglobinkonzentration erzielen, was eben nicht identisch zu sein braucht mit Bildung von mehr Hämiglobin. Die Wirkungsgeschwindigkeit, die die Höhe der erreichten Hämiglobinkonzentration bestimmt und die Wirkungsdauer, die vor allem für die Menge des gebildeten Hämiglobins maßgeblich ist, müssen hier zu einer besseren Charakterisierung herangezogen werden.

Die Wirkungsgeschwindigkeit hat bisher bei pharmakologischen Wirkungen wenig Beachtung gefunden. Bei der Hämiglobinbildung bestimmt sie allein den Gleichgewichtszustand zwischen Oxydation des Hämoglobins und Reduktion des Hämiglobins, da diese eine gegebene konstante Größe ist. Dieser Gleichgewichtszustand ist kein einfaches Gleichgewicht zwischen zwei Stoffen, wie etwa das zwischen Kohlenoxyd und Hämoglobin, wo die Kohlenoxyd-Hämoglobinkonzentration ebenfalls von der Reaktionsgeschwindigkeit des Kohlenoxyds mit dem Hämoglobin (und der Zerfallsgeschwindigkeit des Kohlenoxydhämoglobins) bestimmt wird. Bei der Hämiglobinbildung steht der Wirkungsreaktion eine Erhaltungsreaktion der Zelle gegenüber. Es erscheint möglich, daß auch bei anderen pharmakologischen Wirkungen ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei der Hämiglobinbildung. Wir kennen aber bisher bei zu wenigen Pharmaka die Wirkungsreaktion oder gar die Gegenreaktion genauer. Der Blutfarbstoff ist hier wiederum ein vortreffliches Modell.

Es braucht kaum hervorgehoben zu werden, daß die Wirkungsgeschwindigkeit von mehreren Faktoren bestimmt wird: der Resorptionsgeschwindigkeit, der Geschwindigkeit der Umwandlung des m-Dinitrobenzols in den Hämiglobinbildner und schließlich der Reaktionsgeschwindigkeit dieser Stoffe mit dem Hämoglobin. Für diese 3 Unbekannten haben wir nur eine Gleichung, so daß wir über die Größe der einzelnen Faktoren nichts aussagen können. Wahrscheinlich ist es vor allem der mittlere Faktor, die Umwandlung des m-Dinitrobenzols, der bei verschiedenen Tierarten sehr ungleich ist und so den bald schnelleren (Meerschweinchen) bald langsameren (Hund, Katze) Ablauf der Wirkung bedingt.

Zusammenfassung.

m-Dinitrobenzol in Dosen von 10 und 20 mg/kg bewirkt bei Hunden Erhöhung des Hämiglobingehaltes des Blutes, Bildung von Verdoglobin im Blute, Bildung von HEINZ-Körpern an den roten Zellen, Anämie, leichte Leberschädigungen, zentrale Lähmungen und Krämpfe. Die mittlere tödliche Dosis beträgt 10 mg/kg. Die Wirkungen entwickeln sich langsam und halten meist mehrere Tage an.

Die Anämie entsteht durch Schädigung der roten Zellen und ihren vermehrten Abbau. Ihr Ausmaß ist sehr wechselnd, aber im Mittel von der Dosis abhängig. Die Reparation auch stärkerer Anämien erfolgt in 2—3 Wochen. Die weißen Zellen im Blut nehmen zu.

Der Ablauf der Hämiglobinbildung und der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration im Blute wird näher untersucht. Er bietet ein anschauliches Beispiel für die Einstellung von Fließ-Gleichgewichten bei der Wirkung eines Giftes. Auf die beherrschende Rolle der Wirkungsgeschwindigkeit für die Änderung der Hämiglobinkonzentration im Blute wird hingewiesen.

Fräulein Waltraut Schwarztkopff habe ich für wertvolle Hilfe bei den Untersuchungen zu danken.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol.

II. Mitteilung.

Der Eisenstoffwechsel bei der akuten Vergiftung mit m-Dinitrobenzol.

Von

Andreas Cammerer, Manfred Kiese und Karl Tauschwitz.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. Oktober 1946.)

Eine der wesentlichen Wirkungen des m-Dinitrobenzols ist die Schädigung der roten Zellen, die sich unter anderem in der Bildung von Heinzkörpern ausdrückt, und die Verminderung des Blutfarbstoffs sowie der roten Zellen im Blute. Beide Wirkungen sind wohl in einen ursächlichen Zusammenhang zu bringen und die Anämie als bedingt durch Schädigung der roten Zellen anzunehmen. Mit den starken Änderungen im Blutfarbstoffhaushalt mußten auch solche im Eisenstoffwechsel einhergehen. Durch Bestimmung des Eisengehaltes des Blutserums haben wir versucht, einen Einblick in die Eisenbewegungen während der m-Dinitrobenzolwirkung zu erhalten. Wir haben ferner untersucht, ob die durch m-Dinitrobenzolwirkung eintretende Anämie durch Eisengaben gebessert wurden.

Methoden.

Die Untersuchungen wurden an Hunden durchgeführt, mit denen wir umfangreiche Erfahrungen über die m-Dinitrobenzolwirkung besaßen. Es wurden fast ausschließlich Dosen von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol angewendet, die den Hunden als 2%ige Lösung in Mohnöl an 4 Stellen unter die Haut gespritzt wurden. Die Tiere wurden möglichst gleichmäßig mit einem gemischten Futter aus Haferflocken, Kartoffeln oder Teigwaren und Pferdefleisch ernährt. Zellzahl und Blutfarbstoffe wurden wie in früheren Untersuchungen bestimmt[1].

Die Bestimmung der Eisenkonzentration im Serum wurde nach dem Verfahren von Heilmeyer und Plötner[2] durchgeführt. Die Blutentnahmen zur Eisenbestimmung mußten mit besonderer Vorsicht ausgeführt werden, da die roten Zellen des Hundes sehr empfindlich sind

[1] Kiese, Manfred: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 361 (1949). — [2] Heilmeyer, L. u. K. Plötner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena 1937.

und nach der Schädigung mit m-Dinitrobenzol besonders leicht hämolysierten. Ein Teil der Versuche konnte nicht verwertet werden, da in wichtigen Phasen der Vergiftung kein blutfarbstofffreies Serum zu erhalten war. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut vorsichtig zentrifugiert. Das mit Salzsäure angesäuerte Serum wurde mit Trichloressigsäure enteiweißt, das Filtrat durch Zusatz von Natriumazetat auf p_H 4,5 gebracht, das Eisen mit Sulfit reduziert und mit o-Phenanthrolin ein rotgefärbter Komplex gebildet. Für die Analyse wurde 1 ml des enteiweißten Serumfiltrates verwendet und nach Zusatz der weiteren Reagenzien auf 3 ml aufgefüllt. Die gefärbte Lösung wurde in einer Mikroküvette von 30 mm Schichtdicke im Photometer von Havemann[3] photometriert. Grünes Licht wurde aus dem Licht der Glühlampe mit den Filtern BG 7 und GG 11, je 1,5 mm stark, erhalten.

Versuche.

1. Änderung des Eisengehaltes des Serums durch die m-Dinitrobenzolwirkung.

Der Eisengehalt des Serums von 25 Hunden, die für die hier ausgewerteten Versuche verwendet wurden, betrug vor der Einwirkung von m-Dinitrobenzol im Mittel $135 \pm 6\,\gamma$/100 ml Serum, als äußerste Werte wurden 80 bzw. $185\,\gamma$/100 ml beobachtet.

Nach der subkutanen Injektion von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol stieg der Eisengehalt des Serums schnell an und war zusammen mit dem Anstieg der Hämiglobinkonzentration die Größe, die sich unter der Wirkung des m-Dinitrobenzols am schnellsten änderte. Die höchste Konzentration wurde nach etwa 24 Stunden erreicht, sie betrug im Mittel $505 \pm 40\,\gamma$/100 ml, das entspricht einer mittleren Erhöhung um $370\,\gamma$/100 ml. Die geringste Erhöhung betrug 170 und die größte $750\,\gamma$/100 ml. Der Eisengehalt blieb nur kurze Zeit auf seiner Höhe und sank zunächst schnell, dann langsamer wieder ab. Am 2. Tage nahm der Eisengehalt im Mittel um $180 \pm 20\,\gamma$/100 ml ab. Nach 3 Tagen betrug er im Mittel $240 \pm 20\,\gamma$/100 ml und war nach 6 Tagen wieder im Bereich der Ausgangswerte. Von einer ausführlichen Tabulierung der Daten können wir absehen und stellen statt dessen den Ablauf der Wirkung an einigen Beispielen dar, wobei auch die Beziehungen zur Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, des Hämiglobins, der roten Zellen und der Zahl der Heinz-Körper wesentlich anschaulicher wird. In Abb. 1 ist ein Versuch wiedergegeben, in dem ein nur mäßiger Anstieg der Eisenkonzentration im Serum beobachtet wurde, aber der Anstieg erfolgte, wie immer, sehr schnell und war seinem Höchstwert schon nahe, als die Zahl der Heinz-Körper im Blute

[3] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105; **306**, 224 (1939).

noch sehr gering war und die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration eben erst begann. Die Blutfarbstoffkonzentration nahm dann im Laufe von 3 Tagen ganz ungewöhnlich stark ab, von 14,8 auf 4,0 g/100 ml, während die Konzentration des Eisens im Serum ebenfalls abnahm. Weder in diesem Versuch noch in den anderen — mit einer Ausnahme — blieb die Eisenkonzentration länger als 24 Stunden auf der maximalen Konzentration oder ihr auch nur annähernd nahe, auch wenn, wie im

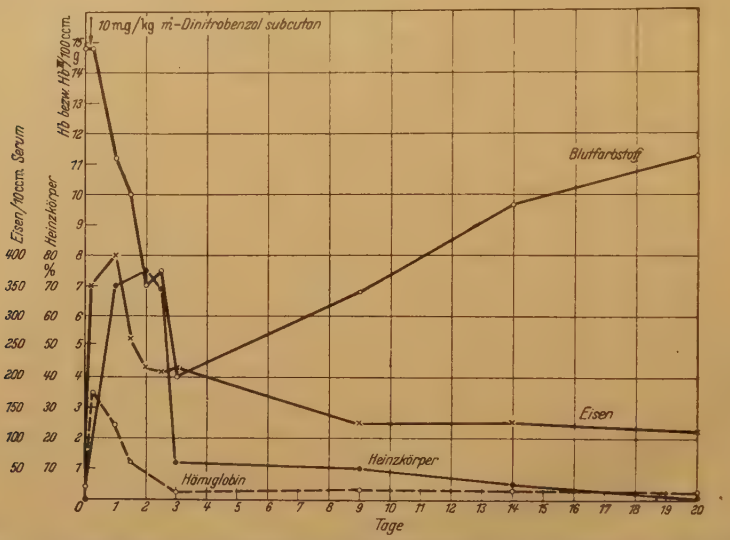


Abb. 1. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, des Hämiglobins, der Heinz-Körper und des Eisens im Serum bei akuter Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Starke Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration bei mäßiger Zunahme der Eisenkonzentration. Hund 20,5 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst, an 4 Stellen subkutan injiziert. Der erste Abszissenmaßstab (links) gibt γ Eisen je 100 ml Serum an.

Versuch der Abb. 1, die stärkere Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration erst später folgte. Die einzige Beobachtung einer längerdauernden Erhöhung der Eisenkonzentration betrifft einen Versuch, der in Abb. 3 Versuch 2 wiedergegeben ist. Die Blutfarbstoffkonzentration blieb hier unverändert. In fast allen Versuchen hatte die Kurve der Änderung der Eisenkonzentration im Serum große Ähnlichkeit mit der der Änderung der Hämiglobinkonzentration, wenn auch der Ablauf der Änderung etwas langsamer erfolgte (Maximum bei 24 Stunden gegenüber 12 beim Hämiglobin). Die Heinz-Körper erreichten ihren höchsten Wert ebenfalls erst, wenn die Eisenkonzentration bereits wieder im Abfallen war.

Wies schon der Ablauf der Änderung der Eisenkonzentration und Blutfarbstoffkonzentration im Versuch der Abb. 1 darauf hin, daß ein zeitlicher Zusammenhang der beiden Vorgänge nicht besteht, so

zeigt ein Vergleich mit anderen Versuchen, daß auch im Ausmaß der beiden Vorgänge keine Beziehungen bestanden. Während die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration im Versuch der Abb. 1 ungewöhnlich stark war, erreichte die Erhöhung der Eisenkonzentration eben den Durchschnitt. In anderen Versuchen konnte bei nur ganz geringer Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration sehr starke Erhöhung der Eisenkonzentration beobachtet werden, so in dem in Abb. 2 wiedergegebenen Versuch. Heinz-Körper traten in diesem Versuch in der durchschnittlichen Menge auf, jedoch war die Verminderung der Blutfarbstoffkonzentration nur sehr gering. Wurde bei den einzelnen Versuchen, die Abweichung der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration und die Abweichung der Zunahme der Eisenkonzentration von ihren Mitteln verglichen, so ergab sich, daß diese Abweichungen in der Hälfte der Fälle gleichsinnig, in der anderen Hälfte ungleichsinnig waren, also ein Zusammenhang zwischen Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration, die in diesen Versuchen 4,5 ± 0,6 g/100 ml betrug, und Zunahme der Eisenkonzentration nicht bestand. Von Interesse ist noch die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration bis zum Erreichen der maximalen Eisenkonzentration, d. h. in den ersten 24 Stunden. Sie betrug im Mittel 1,8 ± 0,4 g/100 ml Blut. Am 2. Tage nahm die Blutfarbstoffkonzentration noch im Mittel um 1,3 ± 0,3 g/100 ml ab.

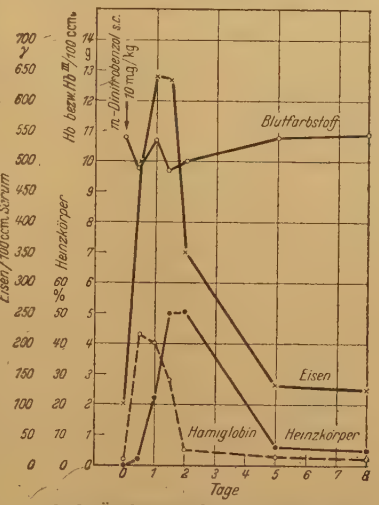


Abb. 2. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, des Hämiglobins, der Heinz-Körper und des Eisens im Serum bei akuter Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Geringe Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration bei starker Zunahme der Eisenkonzentration. Hund 19,5 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst, an 4 Stellen subkutan injiziert.

Wurde die Vergiftung mit m-Dinitrobenzol in Abständen von einer Woche wiederholt, so wurde jedesmal ein Anstieg der Eisenkonzentration ausgelöst. In dem in Abb. 3 dargestellten Versuch wählten wir kleinere m-Dinitrobenzoldosen, um sicher zu sein, daß der Hund mehrere Vergiftungen überlebt. Es wurden Dosen von 7 bzw. 5 und 9 mg/kg m-Dinitrobenzol injiziert. Während nach der ersten Injektion von m-Dinitrobenzol auch eine Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration auftrat, blieb sie nach den folgenden Injektionen von m-Dinitrobenzol aus.

Hatte die Eisenkonzentration im Serum innerhalb 6 Tagen wieder den Bereich der Norm erreicht, so blieb sie weiterhin unverändert. Weder während des Wiederanstiegs der Blutfarbstoffkonzentration noch nach

Reparation der Anämie traten stärkere Schwankungen auf (Abb. 4). Die Eisenkonzentration blieb sogar auffällig konstant. Vor der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol und bei anderen nicht mit m-Dinitrobenzol behandelten Tieren, deren Eisengehalt im Serum über längere Zeit verfolgt wurde, beobachteten wir immer wesentlich stärkere Schwankungen.

Für das Verständnis der Änderungen der Eisenkonzentration im Serum erscheinen Versuche interessant, die zum Studium der Elimination von Verdoglobin aus dem Blute mit Phenylhydrazin an Hunden

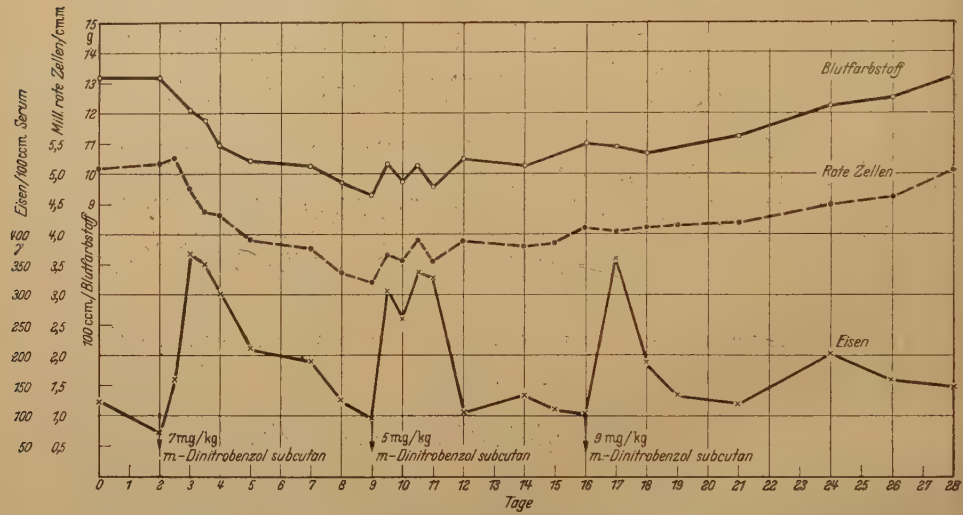


Abb. 3. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs der roten Zellen und des Eisens im Serum nach wiederholter Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Hund 14,0 kg. m-Dinitrobenzol in öliger Lösung subkutan injiziert.

durchgeführt wurden, denen die Milz entfernt worden war (Kiese und Seipelt[4]). Das Phenylhydrazin reagiert mit dem Hämiglobin und anderen Proteinen der roten Zellen viel schneller als das m-Dinitrobenzol, so daß bereits nach einer Stunde die Höchstkonzentrationen an Hämiglobin, Verdoglobinen und Heinz-Körpern erreicht sind. Auch die Eisenkonzentration stieg schon in der ersten Stunde an auf Werte wie sie bei der m-Dinitrobenzolwirkung in 24 Stunden erreicht wurden (Abb. 5). Ferner nahm die Bilirubinkonzentration im Serum zu. Die Blutfarbstoffkonzentration änderte sich in der ersten Stunde nicht, sondern sank erst in den nächsten 2 Stunden erheblich ab. Die Eisenkonzentration, nachdem sie ihr Maximum von 535 γ/100 ml erreicht hatte, sank nicht wieder schnell ab, sondern sehr langsam. Nach 72 Stunden betrug sie noch 430 γ/100 ml.

[4] Kiese, M. u. L. Seipelt: Arch. exper. Path. (D.) **200**, 648 (1934).

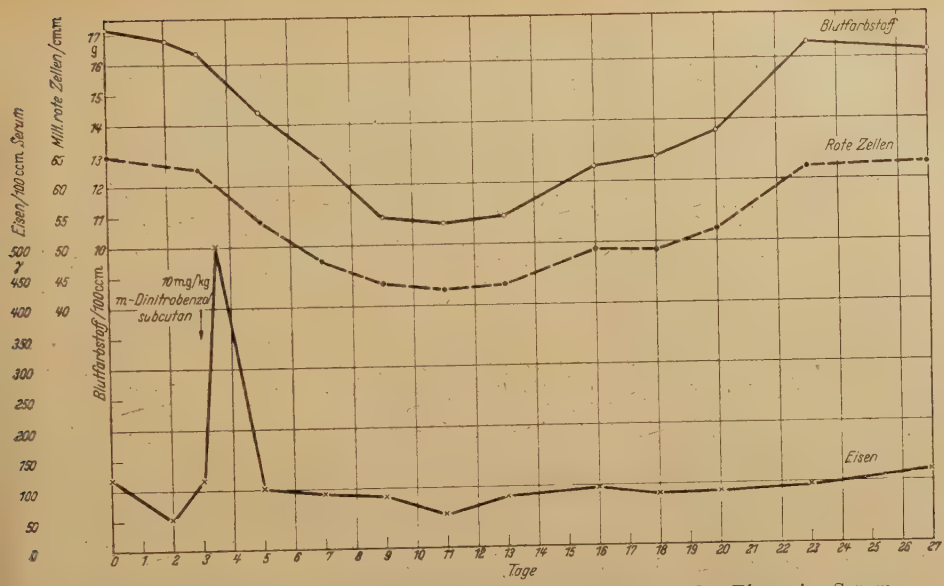


Abb. 4. Konzentration des Blutfarbstoffs, der roten Zellen und des Eisens im Serum während der Heilung der Anämie nach m-Dinitrobenzol. Hund 19 kg. 10 mg/kg m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst, an 4 Stellen subkutan injiziert.

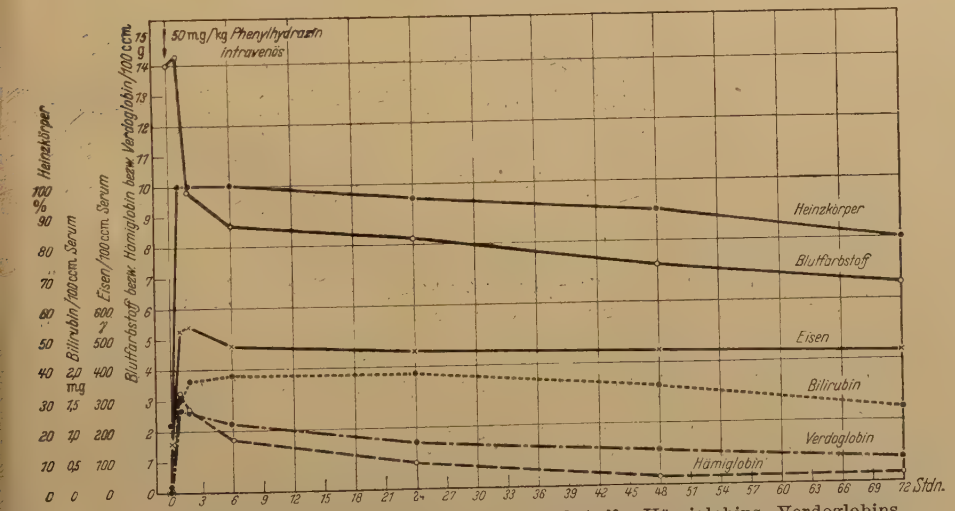


Abb. 5. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins, Verdoglobins, Eisens, Bilirubins und der HEINZ-Körper nach Einwirkung von Phenylhydrazin beim Hunde ohne Milz. Hund 12,9 kg. 50 mg/kg Phenylhydrazin-Hydrochlorid intravenös injiziert.

2. Eiseninjektionen vor und nach m-Dinitrobenzolvergiftung.

Um die Aufnahmebereitschaft der Eisen speichernden Organe zu prüfen, injizierten wir Hunden vor und nach der Wirkung von

m-Dinitrobenzol Eisen intravenös und verfolgten durch wiederholte Eisenbestimmungen den Abfall der Eisenkonzentration im Serum. 50 mg Eisen als Ferroammoniumsulfat wurden in 0,9%iger Kochsalzlösung Hunden von nahezu gleichem Gewicht intravenös injiziert. Nach der Vergiftung erfolgte die Einspritzung, sobald die Blutfarbstoffkonzentration nicht mehr weiter abnahm. Dabei ergab sich ein eindeutiger

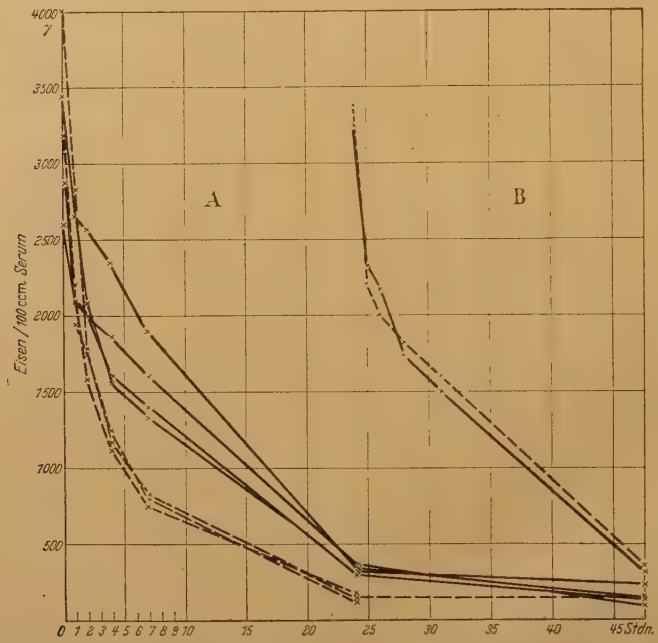


Abb. 6. Abnahme der Eisenkonzentration im Serum nach intravenöser Injektion von 50 mg Eisen als Ferroammoniumsulfat vor und nach Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol. A Eiseninjektion vor x———x und nach x— — —x Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. B Wiederholung der Eiseninjektion am gleichen Tier ohne Vergiftung.

Unterschied im Ablauf der Konzentrationsabnahme vor und nach der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol, der aus den Kurven der Abb. 6 leicht zu ersehen ist. Der Übersichtlichkeit wegen haben wir in Abb. 6 nur einige Versuche wiedergegeben. Andere Versuche führten zu dem gleichen Ergebnis. Nach der Einwirkung von m-Dinitrobenzol verschwand das Eisen schneller aus dem Serum als vorher. Unmittelbar nach der Injektion des Eisens betrug die Eisenkonzentration 3—4 mg/100 ml Serum. Sie fiel nicht in einfacher Abhängigkeit von der Konzentration ab, vielmehr verlief die Abnahme zunächst sehr schnell und verlangsamte in niedrigeren Konzentrationsbereichen verhältnismäßig stark. 2—3 Stunden nach der Injektion wurde der Unterschied in der Konzentrationsabnahme vor und nach der m-Dinitrobenzolwirkung schon deutlich und trat am stärksten nach 7—8 Stunden hervor, wo sich die Eisenkonzen-

trationen fast wie 1:2 verhielten. In den Versuchen nach der m-Dinitrobenzolvergiftung wurde die Ausgangskonzentration innerhalb 24 Stunden erreicht, in den anderen Versuchen erst später. Es wäre denkbar, daß die Änderung der Eisenaufnahme durch die Gewebe nicht durch die m-Dinitrobenzolwirkung bedingt wurde, sondern durch die vorherige Eiseninjektion. Wir haben darum mehrfach bei Tieren, die nicht mit m-Dinitrobenzol vergiftet wurden, die Eiseninjektion wiederholt und fanden wie bei den Kurven B der Abb. 6 immer einen sehr ähnlichen Verlauf.

3. Der Einfluß des Eisens auf die Anämie nach m-Dinitrobenzolvergiftung.

Zur Prüfung des Einflusses wiederholter Eisengaben auf die Heilung der durch die m-Dinitrobenzolwirkung verursachten Anämie wählten wir 3 Hundepaare, die ungefähr den gleichen Abfall der Konzentration des Blutfarbstoffs und der roten Zellen nach der Wirkung des m-Dinitrobenzols aufwiesen. Sobald die roten Zellen und der Blutfarbstoff nicht mehr weiter abnahmen, wurden 3 der Tiere mit Eisen behandelt, bis die Blutfarbstoffkonzentration wieder in der Nähe des Ausgangswertes war, und die anderen 3 als Kontrollen nicht behandelt. Das Eisen wurde als Ferroammoniumsulfat teils in die Vene gespritzt, teils per os verabreicht. Die intravenöse Injektion wählten wir, um bei der Klärung der Frage, ob Eisen die Anämie beeinflußt, ein weiteres Problem auszuschalten, nämlich die Eisenresorption aus dem Darm. Einem Tier wurde das Eisen ausschließlich in Dosen von 50 mg Eisen je Tag intravenös injiziert, die beiden anderen erhielten jeden 2. Tag 50 mg Eisen intravenös und an den dazwischenliegenden Tagen je 220 mg Eisen per os. Vor der täglichen Eisengabe wurde wiederholt der Eisengehalt des Serums bestimmt und immer im Bereich normaler Werte gefunden.

Die ausführliche Wiedergabe der Versuchsergebnisse kann unterbleiben. Jeder Versuch würde nur eine Wiederholung des in Abb. 4 veranschaulichten Ablaufs der Heilung der Anämie sein. Eine Beschleunigung der Heilung der Anämie wurde nicht beobachtet.

Besprechung.

In den ersten 24 Stunden der m-Dinitrobenzolwirkung nahm die Blutfarbstoffkonzentration im Mittel um 1,8 g/100 ml Blut ab. Wurde in der gleichen Zeit dieser Blutfarbstoff auch abgebaut, so mußten bei einem Eisengehalt des Blutfarbstoffs von 0,33% für jede 1,8 g Blutfarbstoff 6 mg Eisen frei werden. Im Serum traten für die 1,8 g Blutfarbstoff 0,37 mg Eisen auf. Es bedarf keines besonderen Hinweises daß ein Auftreten des gesamten freigesetzten Eisens im Serum nicht zu erwarten ist. Die Versuche, in denen Eisen intravenös injiziert wurde, zeigen, wie schnell Eisen aus dem Serum in die Gewebe aufgenommen wird. Auffällig ist jedoch, daß am 2. Tage die Eisenkonzentration bereits wieder um 0,18 mg/100 ml abnahm, obwohl noch weitere 1,3 g/100 ml

Blutfarbstoff mit 3,4 mg Eisen aus dem Blute verschwanden. Diese Tatsache zusammen mit der oben bereits hervorgehobenen Feststellung, daß ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration im Blute und der Zunahme der Eisenkonzentration nicht besteht, machen es wahrscheinlich, daß die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration — wenigstens im Anfang der Wirkung — kein zuverlässiges Maß für den Blutfarbstoffabbau ist. Daß am ersten Tage bereits viele rote Zellen aus dem Blute verschwanden, ist vielleicht auch aus dem allmählichen Ansteigen der Zahl der Zellen mit Heinz-Körpern zu schließen. Zunächst vermag das Retikuloendothel auch die bereits leicht geschädigten Zellen abzufangen. Durch allmähliche Erschöpfung seiner Kapazität verbleiben mehr und mehr geschädigte Zellen (mit Heinz-Körpern) im strömenden Blute. Auf einen starken Blutfarbstoffabbau zur Zeit des Anstiegs der Eisenkonzentration weist auch die gleichzeitige Zunahme der Gallenfarbstoffkonzentration im Serum bei den Versuchen mit Phenylhydrazin hin. Andererseits dürfte an der Verminderung der Eisenkonzentration trotz anhaltenden Blutabbaues die wachsende Aufnahmebereitschaft des Retikuloendothels und anderer Gewebe wie des Knochenmarks (vgl. Stodtmeister und Büchmann[5]) für Eisen mitwirken, die durch die Eiseninjektionen nachgewiesen wurde. Man darf diese Wirkung wohl in Parallele setzen zu den Beobachtungen von Thoenes und Aschaffenburg[6], Heilmeyer und Plötner[2] und Vahlquist[7] über die Verminderung des Eisengehaltes des Serums bei Infektions- und Tumorkrankheiten. „Reizung des retikuloendothelialen Systems", die diese Autoren annehmen bei den Infektanämien, liegt sicher auch bei der Dinitrobenzolwirkung vor, denn es lassen sich sogar anatomische Veränderungen am Retikuloendothelial nachweisen (Kiese[1]).

In Anbetracht der Unsicherheit der Beurteilung des wirklichen Blutfarbstoffverlustes im Beginn der Vergiftung wäre auch an die Möglichkeit zu denken, daß das so schnell während der m-Dinitrobenzolwirkung im Serum auftretende Eisen nicht aus abgebautem Blutfarbstoff stammt, sondern aus Depots ausgeschüttet wird. Aber die Annahme eines stärkeren Blutfarbstoffabbaus als er in der Änderung der Blutfarbstoffkonzentration in Erscheinung tritt, ist wohl wahrscheinlicher.

Für die Speicherung des durch den Zerfall des Blutfarbstoffs freigesetzten Eisens ist wahrscheinlich die Milz von hervorragender Bedeutung. Die Speicherung des Eisens in ihr ist histologisch leicht nachzuweisen. Andererseits verzögert der Ausfall der Milz die Aufnahme des Eisens sehr erheblich. Unter der Wirkung von Phenylhydrazin tritt

[5] Stodtmeisetr, R. u. P. Büchmann: Moderne Eisentherapie. Stuttgart 1943. — [6] Thoenes, F. u. R. Aschaffenburg: Der Eisenstoffwechsel des wachsenden Organismus. Berlin 1934. — [7] Vahlquist, B. C.: Acta paediatr. (Schwd.) Suppl. 28 (1941).

neben Bildung von Hämiglobin, Verdoglobin und Heinz-Körpern auch ein vermehrter Blutzerfall auf mit einem schnellen Anstieg der Eisenkonzentration. Bei Tieren ohne Milz sank die Eisenkonzentration nur langsam wieder ab.

Die Änderungen des Eisengehaltes des Serums bestätigen unseren aus anderen Beobachtungen (Kiese[1]) gezogenen Schluß, daß die Anämie nach m-Dinitrobenzol durch Schädigung der roten Zellen bedingt wird und daß einer Hemmung der Blutbildung im Knochenmark untergeordnete Bedeutung zukommt. Andererseits scheinen auch nach den vorstehenden Versuchen geringe Schädigungen des Knochenmarks möglich zu sein. In der Regenerationsphase lag nie ein — etwa durch Bindung des Eisens im Retikuloendothel bedingter — Eisenmangel vor, der die in vielen Fällen nur mäßigen Retikulocytenkonzentrationen im Blut und den langsamen Anstieg der Blutfarbstoffkonzentration erklären könnte. Nach Untersuchungen von Heath, Strauss und Castle[8] sowie Heilmeyer und Plötner[2] übt intravenös injiziertes Eisen einen Reiz auf die Blutbildung aus. Dieser wurde in unseren Versuchen nicht beobachtet. Zwar übersehen wir hier nur eine kleine Zahl von Versuchen, doch wäre eine nennenswerte Wirkung wohl erkannt worden.

Die Versuche zur Beeinflussung der Anämie nach m-Dinitrobenzol gaben uns Anlaß, einige Fragen der Eisenresorption durch den Darm erneut zu untersuchen. Wir haben über diese Versuche bereits an anderer Stelle berichtet[9].

Zusammenfassung.

Die Änderung der Eisenkonzentration im Serum während und nach der Wirkung von m-Dinitrobenzol wurde bei Hunden untersucht. Nach der subkutanen Injektion von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol stieg die Eisenkonzentration innerhalb 24 Stunden im Mittel von 135 auf 505 γ/100 ml Serum an, fiel am nächsten Tage bereits wieder auf 325 γ/100 ml und erreichte in 6 Tagen wieder den Bereich der Ausgangswerte. Als Ursache der Eisenvermehrung im Serum wurde ein starker Blutzerfall angenommen, der stärker sein mußte als die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration annehmen ließ.

Nach der m-Dinitrobenzolwirkung verschwand intravenös injiziertes Eisen schneller aus dem Serum als vorher, was auf eine gesteigerte Aufnahmebereitschaft der Gewebe für Eisen schließen ließ.

Während der Heilung der durch m-Dinitrobenzol bewirkten Anämie wurde nie eine Verminderung des Eisengehaltes unter normale Werte beobachtet. Intravenöse Eiseninjektionen beschleunigten die Heilung der Anämie nicht. Es wurde als wahrscheinlich angenommen, daß das m-Dinitrobenzol eine geringe Schädigung des Knochenmarks hinterläßt.

[8] Heath, Strauss u. Castle: J. clin. Invest. (Am.) **11**, 1293 (1932). — [9] Heubner, W., M. Kiese u. K. Tauschwitz: Schweiz. med. Wschr. **73**, 81 (1943).

Aus der Universitäts-Hautklinik Leipzig (Leitung: J. Vonkennel).

Thyreostatisch wirksame Substanzen im Tierversuch.

Von

Ernst Huf und Frida Auffarth.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. November 1947.)

Die neuere experimentelle Kropfforschung stützte sich bis zum Jahre 1941 im wesentlichen immer wieder auf Versuche, die gezeigt haben, daß es durch reichliche Verfütterung verschiedener Vegetabilien, insbesondere aller Kohlarten bei Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden, Ziegen, Schafen, nach Wochen und Monaten gelingt, eine starke, zum Teil enorme Vergrößerung der Schilddrüsen zu erzielen. Diese Untersuchungen traten in ein neues Stadium ein, als Richter und Clisby 1941[1] und bald darauf Kennedy 1942[2] die Beobachtung machten, daß Thioharnstoff bei Ratten bzw. Allylthioharnstoff bei Kaninchen ebenfalls Kröpfe wie nach Verfütterung von gewissen Vegetabilien erzeugen. In der Folgezeit wurden noch weitere chemisch wohl definierte Stoffe mit ähnlicher Wirkung gefunden: Thiouracil, Sulfaguanidin, überhaupt die bekanntesten Sulfonamide, Rhodankalium[3–6].

Es ist nun bemerkenswert, daß nach den Arbeiten der genannten und anderer Forscher diese Kröpfe histologisch hyperplastische Drüsen von basedowartiger Struktur darstellen, trotzdem aber funktionell ausgesprochen unterwertig sind und daß sich die Hyperplasie durch Verabreichung von anorganischem Jod meist nicht unterdrücken läßt. Dagegen unterbleibt die Kropfbildung, wenn man den Versuchstieren z. B. Thioharnstoff und gleichzeitig Thyroxin gibt. Der Jodstoffwechsel ist unter dem Einfluß der genannten Pharmaka in dem Sinn gestört, daß anorganisches Jod nicht mehr in organisch gebundenes Jod, in Thyroxin, übergeführt werden kann, daß es also deshalb zu einem Thyroxinmangel im Körper kommt. Dementsprechend ist auch der Grundumsatz von Ratten, die mit Sulfaguanidin behandelt worden waren, erniedrigt gefunden worden[4]. Diesen Befund hat man dann sofort zum Anlaß genommen, die Basedowsche Krankheit mit Thioharnstoff oder Thiouracil zu behandeln.

Es liegen hierzu bereits mehrere Arbeiten vor[7–10]. Übereinstimmend wird berichtet, daß es durch Tagesdosen von 1—2 g Thioharnstoff oder 0,1—0,2 g Thiouracil beim Basedow gelingt, den Grundumsatz zu senken und auch andere mit der Krankheit verknüpfte Veränderungen mehr oder weniger zum Ver-

schwinden zu bringen. Alle Autoren, vor allem auch Haler[12] und Welshman[13], sowie Newcomb[14] sehen in dieser Therapie vorläufig aber eine gewisse Gefahr, da es anscheinend mit Thioharnstoff oder Thiouracil beim Menschen leicht zur Agranulozytose kommt. Strenge klinische Überwachung scheint also erforderlich zu sein.

Außer der Erniedrigung des Grundumsatzes sprechen noch eine Reihe weiterer Beobachtungen für eine Störung des Jodstoffwechsels der Schilddrüse in obengenanntem Sinn, also für verminderte Thyroxinproduktion. So unterbleibt z. B. die Hyperplasie der Schilddrüsen bei Behandlung hypophysektomierter Tiere[4, 15]. Dies wird von den amerikanischen Forschern so gedeutet, daß der z. B. nach Thiouracilbehandlung verminderte Thyroxingehalt im Tierkörper infolge des Fehlens der Hypophyse sich nicht mehr als Reiz zu vermehrter Bildung bzw. Ausschüttung von thyreotropem Hormon auswirken kann (Wirkungsmechanismus der genannten Pharmaka).

Eine Unterfunktion der hyperplastischen Schilddrüsen ergibt sich auch aus den Versuchen von Hughes[16], der durch Behandlung von Muttertieren oder neugeborenen Ratten mit Thiouracil Kretinismus auslösen konnte, zu dem es jedoch bei gleichzeitiger Thyroxingabe nicht kam. Schließlich weisen auch die Versuche[17–19] über die Verarbeitung und Speicherung von angebotenem radioaktivem J^{131} darauf hin, daß unter dem Einfluß von Rhodankalium, Thiouracil und Sulfonamiden kein oder nur wenig Jod in der Schilddrüse gebunden wird.

Nach den bisher vorliegenden Tierversuchen ist man mithin berechtigt, von einer Unterbrechung der Schilddrüsenfunktion, von einer „*funktionellen Thyreostase*“[20] zu sprechen, und man kann daher Stoffe, die diese lähmende Wirkung auf die Schilddrüsenfunktion haben, als *thyreostatische Substanzen* bezeichnen, ähnlich, wie man in der Chemotherapie von bakteriostatischen Stoffen spricht und damit die lähmende Wirkung dieser Stoffe auf die Lebensvorgänge in den Bakterien zum Ausdruck bringen will. Über den genauen, primären Angriffspunkt der thyreostatischen Substanzen, finden sich, soweit zu sehen, auch im amerikanischen Schrifttum keine ganz schlüssigen Ergebnisse. Nach den histochemischen Untersuchungen von Dempsey[21] hat man im Thiouracil ein Fermentgift zu sehen, das die ätherartige Kondensation von Dijodtyrosin zu Thyroxin hemmt.

Im deutschen Schrifttum sind bisher keine an diese neuesten amerikanischen Arbeiten anknüpfenden Untersuchungen niedergelegt worden. Es ist auch anzunehmen, daß die zitierten Arbeiten infolge der zur Zeit schwierigen Literaturbeschaffung weiten Kreisen noch unbekannt sind. Lediglich Wagner-Jauregg und Schreiber[22] haben sich experimentell mit diesem Thema befaßt, und es gelang ihnen, wie früher Kennedy[2] durch Behandlung von 3 Kaninchen mit Allylthioharnstoff Kröpfe mit basedowartiger Feinstruktur zu erzeugen. Wagner-Jauregg und Schreiber vermuten aber, daß diesen hyperplastischen Drüsen auch eine gesteigerte Funktion entspricht,

während die Amerikaner inzwischen mit Sicherheit eine Funktionsminderung nachgewiesen zu haben glauben.

Wir haben aus verschiedenen Gründen die amerikanischen Arbeiten aufgegriffen und experimentell fortgeführt. Einmal muß man gerade in der experimentellen Kropfforschung auf die Nachbearbeitung der an einem Ort oder an einigen wenigen Orten erzielten Ergebnisse besonderen Wert legen. Hebt doch ein langjähriger Kenner dieses Gebietes, Isenschmid[23] gerade im vergangenen Jahr wieder ausdrücklich hervor: „Wir müssen bei der Beurteilung auch der Tierversuche mit strumigenen Agenzien die Tatsache voranstellen, die besonders aus der Kropfforschung beim Menschen klar hervorgeht, daß das Wichtigste, das beherrschende Agens, welches den endemischen Kropf erzeugt, streng ortsgebunden ist...“

Besonderes Interesse hatte für uns die Beobachtung, daß auch die Sulfonamide thyreostatisch wirksam sein sollen. Da uns aber hierzu nähere Angaben ganz fehlen, so haben wir selbst Versuche mit den wichtigsten Sulfonamiden und chemischen Bruchstücken derselben durchgeführt, schon um darnach abschätzen zu können, ob man bei der heute üblichen Sulfonamidtherapie beim Menschen mit einer unerwünschten Beeinflussung der Schilddrüse zu rechnen hat oder nicht. Wir stellten uns weiterhin die Frage, ob auch das stark bakteriostatisch wirksame Diaminodiphenylsulfon, das aber nicht in die Gruppe der Sulfonamide gehört und das in Form des Digalaktosids als „Tibatin“ im Handel ist, thyreostatisch wirkt. Da dies in der Tat der Fall war und sich somit die Frage aufdrängte, ob umgekehrt alle thyreostatischen Substanzen auch bakteriostatisch wirksam sind, so haben wir an der mit Streptococcus Aronson infizierten Maus einmal die bakteriostatische Wirkung von Thioharnstoff und Thiouracil geprüft. Weitere Versuche waren der Frage gewidmet, welche Wirkung die p-Aminobenzoesäure, allein und in Kombination mit Sulfonamid auf die Schilddrüsenfunktion hat.

Gar keine Anhaltspunkte fanden wir bisher darüber, ob (außer der Hypophyse) auch andere, insbesondere endokrine Organe unter dem Einfluß der thyreostatischen Substanzen in Mitleidenschaft gezogen werden. Wir haben daher in dieser Richtung neues Material gesammelt und teilen hier die Ergebnisse der Gewichtsbestimmungen mit*. Mit der gleichen Absicht, die Frage der endokrinen Korrelationen aufzugreifen, haben wir schließlich einen Versuch unternommen, mit Hilfe von östrogenem Stilben über den Hypophysenvorderlappen die Wirkung des Thioharnstoffs auf die Schilddrüse zu beeinflussen.

* Die histologischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Bachmann vom Anatomischen Institut Leipzig durchgeführt.

Versuchsmethodik.

Zu den im Spätherbst und Winter durchgeführten Versuchen wurden weibliche und männliche, meist weiße, einzelne schwarzweiße Ratten verschiedener Herkunft im Gewicht von etwa 80—160 g herangezogen; einzelne Tiere wogen etwas weniger als 80 g. Als Versuchsraum diente ein mäßig beleuchteter Tierstall, der eine mittlere Temperatur von 22° hatte. Je 2—5 Ratten hielten sich in einem angemessen großen Aquariumglas auf, dessen Boden mit Sägespänen bedeckt war. Die Tiere saßen direkt auf den Spänen. Als Futter wurde regelmäßig Hafer, Kleie, mehrmals in der Woche gekochte und gemahlene Leber sowie Frischgemüse und trockenes Brot gegeben. Leitungswasser ad libitum. An den Gemüsetagen wurde kein Wasser angeboten.

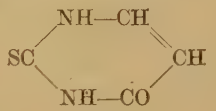
Die amerikanischen Forscher haben die zu prüfenden Substanzen meist dem Futter beigemischt oder im Trinkwasser gelöst angeboten. Wir haben im Interesse einer genauen Dosierung alle Stoffe* mit der Schlundsonde direkt in den Magen gegeben. Nur Elityran, das native Schilddrüsenpräparat der Firma „Bayer" wurde subkutan gespritzt. Alle verfütterten Chemikalien (bis auf Jodkalium, das in Wasser gelöst war) wurden (wenn nichts anderes gesagt ist) in einer Gummiarabicum-Lösung (Mucilago Gummi arabicum 1:1 mit Wasser verdünnt) gelöst bzw. kräftig aufgeschüttelt. Die Dosierung wurde dem Körpergewicht der Tiere angepaßt, so daß alle Tiere einer Serie bezogen auf 100 g Körpergewicht die gleiche Substanzmenge in 0,5 cm^3 Lösung erhielten. Um diese Bedingung auch während der Versuchszeit möglichst aufrecht zu erhalten, wurden alle Tiere etwa nach Ablauf der halben Versuchsdauer noch einmal gewogen und die Dosierung erneut dem Körpergewicht angepaßt. In den meisten Fällen erstreckte sich die Versuchszeit auf 14 Tage. Einige Versuche liefen nur 10 Tage lang. Die Verabreichung der zu prüfenden Stoffe erfolgte täglich. Am Ende der Versuchszeit wurden die Ratten in kleinen Gruppen nacheinander im Ätherdampf getötet. Die Sektion erfolgte sofort nach dem Tod. Kleine Organe, wie die Schilddrüsen, die Nebennieren u. ä. wurden auf einer Torsionswaage, größere auf einer analytischen Waage gewogen. Sämtliche gefundenen Organgewichte wurden auf 100 g Körpergewicht umgerechnet. Bei paarigen Organen haben wir das Gewicht beider Organe zusammen ermittelt. Die Schilddrüsen der unbehandelten Rattenmännchen fanden wir im Durchschnitt etwas leichter als die der Rattenweibchen (s. Tabelle 7 und 8). Der Unterschied war jedoch nicht bedeutend, und wir haben daher bei der Berechnung der Versuchsresultate keine weitere Rücksicht auf das Geschlecht genommen, dies um so weniger, als meist weibliche Tiere zur Verwendung kamen. und die Männchen sich zufällig in den verschiedenen Gruppen verteilt fanden. Wenn man genügend Tiere zur Auswahl hat, so sollte man männliche Ratten bevorzugen. Verwendet man Rattenweibchen, so ist es gut, darauf zu achten, daß sie möglichst nicht gravide sind. — Betreffs der von uns durchgeführten histologischen Untersuchungen der Mehrzahl der Schilddrüsen verweisen wir auf die Ausführungen von Romeis[24], an die wir uns gehalten haben. Wir haben zur Orientierung des Aktivitätszustandes der Schilddrüsen nur Hämatoxylin-Eosin-Färbungen ausgeführt. Weitere Einzelheiten sowie Abweichungen von der hier angegebenen Methode werden bei Schilderung der betreffenden Versuche erwähnt.

---

* Thiouracil wurde von der *I. G. Farbenindustrie AG.* hergestellt, die uns auch Thioharnstoff und einige Sulfonamide sowie Elityran und Cyren A lieferte. Weitere Sulfonamide und chemische Bruchstücke derselben, sowie Diaminodiphenylsulfon erhielten wir von Herrn Dr. Kimmig. Das verwendete Thyroxin stammt von der Firma *Hoffmann-La Roche.*

Ergebnisse.

1. Die Wirkung S-haltiger Verbindungen, der Sulfonamide und des Diaminodiphenylsulfons. Rhodankalium, Thioharnstoff und Thiouracil erzeugten in Tagesdosen von wenigen Zentigramm eine starke Gewichtsvermehrung der Schilddrüsen (s. Tabelle 1). Die Vergrößerung der Schilddrüsen ließ sich immer schon bei der Sektion der Tiere erkennen.



Thiouracil

Während bei den Kontrolltieren die beiden Schilddrüsenlappen sich relativ klein und blaß bis bräunlich-rot darboten und ein Isthmus meist kaum hervortrat, waren die Schilddrüsen der behandelten Ratten stark vergrößert, von dunkelroter Farbe, und der Isthmus war fast immer deutlich wahrnehmbar (s. Abb. 1). Die erzielten Gewichtssteigerungen lagen für die 3 genannten Präparate in der angegebenen Dosierung zwischen 100 und 200%, verglichen mit den Schilddrüsengewichten unbehandelter Kontrolltiere.

Von den geprüften bakteriostatischen Substanzen (Sulfonamide und Diaminodiphenylsulfon) war im gleichen Dosierungsbereich (20 bis 50 mg je Tag) Prontalbin (Sulfanilamid), also der Grundkörper aller Sulfonamide nicht, Cibazol = Eleudron (Sulfathiazol), höchstens schwach auf die Schilddrüse wirksam (s. Tabelle 1). Alle übrigen

Tabelle 1. *Die Wirkung verschiedener S-haltiger Pharmaka und einiger bakteriostatischer Substanzen auf das Schilddrüsengewicht nach 14tägiger peroraler Verabreichung.*

Präparat	Dosis mg/100 g Körpergewicht täglich	Tierzahl	Körpergewicht Anfang	Körpergewicht Ende	Δ Körpergewicht in %	Niedrigstes und höchstes Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Durchschnittliches Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Δ Schilddrüsengewicht in %
Unbehandelt	—	17	—	136	—	11,5—24,7	16,8	—
Rhodankalium	50	6	138	144	+ 4	28,3—87,5	46,8	+ 179
Thioharnstoff	5	2	96	98	+ 2	15,5—16,2	15,9	− 5
Thioharnstoff	50	10	118	117	— 1	30,1—50,5	39,4	+ 135
Thiouracil	35	11	116	112	— 3	24,5—43,4	35,6	+ 112
Prontalbin	35	7	109	122	+ 12	12,4—21,0	16,8	0
Eubasin	50	6	112	120	+ 7	19,1—45,3	31,2	+ 86
Pyrimal	20	11	126	148	+ 17	16,3—43,6	26,1	+ 55
Cibazol	50	5	127	143	+ 13	18,2—27,8	21,1	+ 26
Globucid	30	10	111	118	+ 6	9,1—46,1	22,5	+ 34
Sulfaguanidin	30	6	115	124	+ 8	15,4—38,6	26,1	+ 55
Diaminodiphenylsulfon	3,5	6	127	150	+ 18	14,2—26,8	17,5	+ 4
	15	9	130	110	− 15	25,7—41,1	36,0	+ 114

Δ = Differenz (Mittelwerte).

Sulfonamide sowie Diaminodiphenylsulfon (dieses in der angegebenen höheren Dosierung) verursachten eine deutliche Erhöhung des durchschnittlichen Schilddrüsengewichts.

In Ergänzung zu Tabelle 1 haben wir in der Abb. 2 die bei 98 nicht behandelten und behandelten Ratten gemessenen Schilddrüsengewichte in Gewichtsklassen aufgeteilt. Man ersieht hieraus, wie (in der gewählten Reihenfolge) bei unseren Versuchen vom Sulfaguanidin ab die Anzahl der schweren gegenüber der Anzahl der leichteren Schilddrüsen zunahm. Pyrimal ist wahrscheinlich etwas wirksamer als gefunden und angegeben, da sich unter den 11 behandelten Ratten 4 gravide

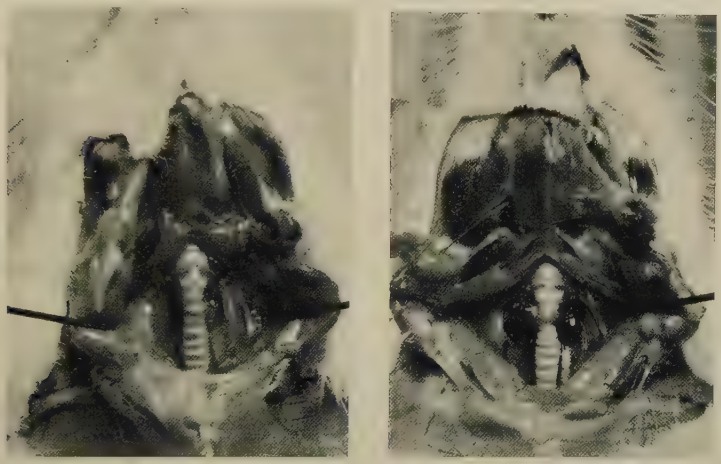


Abb. 1. Sektionsbilder von 2 etwa gleichschweren Rattenweibchen. Links: Unbehandeltes Tier. Rechts: Tier 14 Tage lang täglich mit 50 mg/100 g Rhodankalium per os behandelt. Sektion am 15. Tag.

Weibchen fanden. Infolge der durch die Gravidität einsetzenden Körpergewichtszunahme mußten die auf 100 g Körpergewicht bezogenen Schilddrüsengewichte zu niedrig ausfallen.

Histologisch zeigten die Schilddrüsen ohne Unterschied bezüglich des Präparates, das die Vergrößerung veranlaßt hat, immer dieselben Veränderungen, deren wesentliche Merkmale die folgenden waren: Polymorphie der Follikel, Bildung von Epithelpolstern und Epithelleisten, die in das Lumen des Follikels hineinragten, Desquamation des Epithels, Hyperämie und völliges Fehlen des Kolloids. Wir geben in Abb. 3 ein Beispiel für viele ähnlich gefundene Fälle. Öfters konnten wir beobachten, daß große Teile des histologischen Schnittes völlig mit Epithel ausgefüllte Follikel besaßen.

2. Die Wirkung von Thioharnstoff und Rhodankalium in Kombination mit Jod. Bei allen experimentellen Kropfversuchen pflegt man

vor allem die Frage zu prüfen, wie sich das strumigene Agens bei gleichzeitigem Jodangebot auswirkt. Wir haben, gleich den amerikanischen

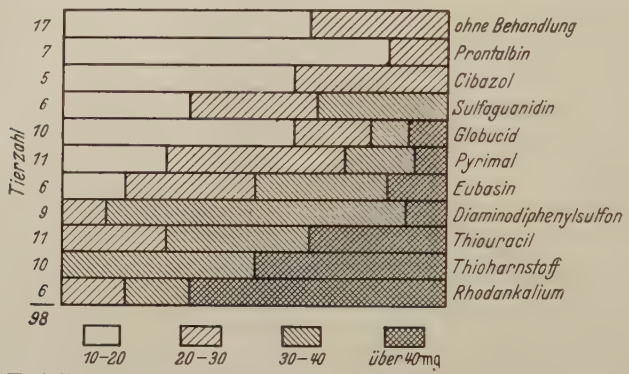


Abb. 2. Verteilung der Schilddrüsengewichte von 98 in der Tabelle 1 genannter Versuchstiere auf 4 verschiedene Gewichtsklassen.

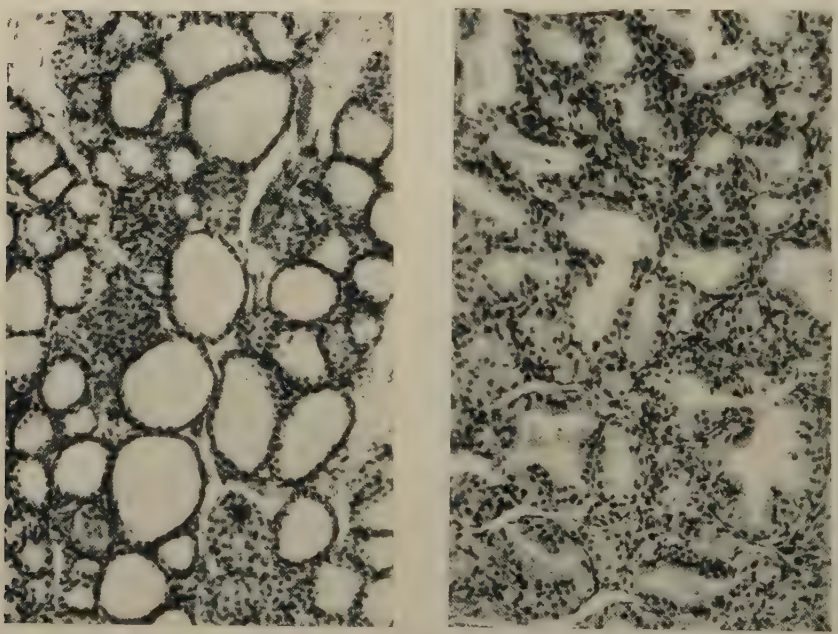


Abb. 3. Histologische Schilddrüsenveränderungen nach Thiouracilbehandlung. Links: Unbehandeltes Tier. Schilddrüsengewicht 14,5 mg/100 g Körpergewicht. Rechts: Tier 14 Tage lang täglich mit 35 mg/100 g Thiouracil per os behandelt. Schilddrüsengewicht 42 mg/100 g Körpergewicht. Sektion am 15. Tag.

Forschern, diese Frage beim Thioharnstoff und beim Rhodankalium geprüft. Jod kam sowohl als Jodion (Jodkalium) als auch organisch

gebunden in Form eines Schilddrüsenextraktes (Elityran „Bayer"), als jodiertes Kasein (Elityran K „Bayer") oder auch als Thyroxin zur Anwendung. Vom Jodkalium gaben wir täglich 20 γ, also eine — physiologisch gedacht — reichliche Menge, vom Elityran und Elityran K jeweils eine Meerschweincheneinheit, vom Thyroxin 10 γ. Aus Tabelle 2 ergibt sich, daß Ratten, die nur mit Jodkalium behandelt wurden, gegenüber unbehandelten Tieren kleinere Schilddrüsen aufwiesen; sie wogen 39% weniger. Histologisch boten sie das Bild

Tabelle 2. *Die Wirkung von Thioharnstoff sowie anorganischem und organischem Jod auf das Schilddrüsengewicht nach 10tägiger peroraler Verabreichung.* Elityran subkutan gespritzt (Mittelwerte).

Präparat	Dosis oder mg/100 g Körpergewicht täglich	Tierzahl	Körpergewicht Anfang	Körpergewicht Ende	Δ Körpergewicht in %	Niedrigstes und höchstes Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Durchschnittliches Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Δ Schilddrüsengewicht in %
Unbehandelt	—	17	—	136	—	11,5—24,7	16,8	—
Jod (KJ)	20	4	124	137	+ 10	8,9—11,5	10,3	— 39
Thioharnstoff . . .	50 mg	3	128	140	+ 9	26,7—33,1	30,0	+ 79
Jod (KJ) + Thioharnstoff . .	20 γ 50 mg	4	123	131	+ 7	24,2—34,4	29,7	+ 77
Elityran + Thioharnstoff . .	1 MSE* 50 mg	3	113	114	+ 1	7,1— 9,0	7,8	— 54
Elityran K + Thioharnstoff . .	1 MSE 50 mg	3	144	136	— 6	7,2— 9,1	7,9	— 53

* 1 MSE = 1 Meerschweincheneinheit; d. i. diejenige tägliche Menge, die innerhalb von 6 Tagen beim Meerschweinchen im Gewicht von 250—300 g eine Reduktion des Körpergewichts um mindestens 10% verursacht.

eines maximalen Ruhezustandes. Alle Follikel waren mit gleichmäßig rot gefärbtem Kolloid gefüllt, was man bei einer nicht mit Jodkalium behandelten Normalratte selten sieht. Thioharnstoff erzeugte nach 10tägiger Verabreichung eine starke Erhöhung des Schilddrüsengewichts (+79%). Die Wirkung des Thioharnstoffs wurde durch die gleichzeitige Gabe von Jodkalium nicht unterdrückt. Ganz im Gegensatz dazu war der Thioharnstoff völlig wirkungslos auf die Schilddrüse, wenn den Tieren während der Thioharnstoffbehandlung Schilddrüsenextrakt oder jodiertes Kasein zugeführt wurde. Hier waren die Schilddrüsen der kombiniert behandelten Ratten sogar nur halb so schwer wie die der völlig unbehandelten Kontrolltiere.

Anders lagen die Verhältnisse beim Rhodankalium, das wir teils ohne, teils mit Thyroxin (dieses in ganz verdünnter Natronlauge gelöst)

verabreichten. Hier verhinderte sowohl Thyroxin wie auch Jodkalium die bei der Rhodankaliumbehandlung auftretende Gewichtsvermehrung der Schilddrüsen (s. Tabelle 3). Jodkalium allein bewirkte auch hier wieder eine Abnahme des Schilddrüsengewichts, was beim Thyroxin nicht der Fall war.

3. Die Wirkung von p-Aminobenzoesäure und Pyrimal. Vom Bakterienkulturversuch und vom Versuch an der infizierten Maus her weiß man, daß p-Aminobenzoesäure die bakteriostatische Wirkung der Sulfonamide aufzuheben vermag. Diese Versuche sind in den

Tabelle 3. *Die Wirkung von Rhodankalium sowie von anorganischem und organischem Jod auf das Schilddrüsengewicht nach 10tägiger peroraler Verabreichung* (Mittelwerte).

Präparat	Dosis oder mg/100 g Körpergewicht täglich	Tierzahl	Körpergewicht Anfang	Körpergewicht Ende	Δ Körpergewicht in %	Niedrigstes und höchstes Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Durchschnittliches Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Δ Schilddrüsengewicht in %
Unbehandelt	—	17	—	136	—	11,5—24,7	16,8	—
Jod (KJ)	20	5	114	119	+ 4	11,6—15,5	13,3	— 21
Thyroxin	10	5	108	107	— 1	11,5—20,3	16,5	— 2
Rhodankalium . . .	50 mg	5	124	135	+ 9	26,1—50,0	35,2	+ 110
Jod (KJ) + Rhodankalium . .	20 50 mg	4	122	126	+ 3	9,7—22,2	15,5	— 8
Thyroxin + Rhodankalium . .	10 50 mg	5	116	120	+ 3	10,5—14,8	13,4	— 20

letzten Jahren so viel ausgeführt und diskutiert worden, daß wir auch im Hinblick auf die thyreostatische Wirkung der Sulfonamide den Einfluß der p-Aminobenzoesäure auf die Schilddrüse einer Prüfung unterzogen. Die diesbezüglichen Versuchsresultate sind in Tabelle 4 zusammengefaßt, die zeigt, daß p-Aminobenzoesäure selbst eine beträchtliche Gewichtssteigerung der Schilddrüsen hervorzubringen vermochte. In Kombination mit Pyrimal war der Effekt etwa der gleiche. Die angegebene Gewichtserhöhung der Schilddrüsen nach alleiniger Pyrimalgabe ist, wie schon unter 1. erwähnt, wahrscheinlich etwas zu niedrig. Die Dosierung der p-Aminobenzoesäure war im Vergleich zur Pyrimaldosis sehr hoch gewählt worden, das Verhältnis betrug etwa 12:1. Hierfür waren die Erfahrungen im Bakteriostasetest maßgebend, doch wäre es nach dem Ausfall unserer Versuche gut gewesen, auch niedrigere Dosen von p-Aminobenzoesäure zu prüfen.

Die Dosis von 250 mg je 100 g Körpergewicht täglich wurde in 2 gleichen Teilen am Vor- und Nachmittag verabreicht. Die Fütterung eines so dicken Breies (40 g mit verdünnter Gummi arabicumlösung ad 200 cm³ angerieben) mit der Schlundsonde war technisch etwas schwierig.

4. Prüfung der bakteriostatischen Wirksamkeit von Thioharnstoff und Thiouracil. Nach allem, was im vorangehenden geschildert wurde, war es naheliegend, einmal zu prüfen, ob Thioharnstoff und Thiouracil außer ihrer thyreostatischen Wirkung auch eine bakteriostatische Wirkung besitzen, so wie die Sulfonamide und Diaminodiphenylsulfon bakteriostatisch, aber auch mehr oder weniger thyreostatisch aktiv sind. Wir haben zur Beantwortung dieser Frage den Mäusetherapieversuch herangezogen.

Tabelle 4. *Die Wirkung von Pyrimal und p-Aminobenzoesäure auf das Schilddrüsengewicht nach 14tägiger peroraler Verabreichung* (Mittelwerte).

Präparat	Dosis mg/100 g Körpergewicht täglich	Tierzahl	Körpergewicht Anfang	Körpergewicht Ende	Δ Körpergewicht in %	Niedrigstes und höchstes Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Durchschnittliches Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Δ Schilddrüsengewicht in %
Unbehandelt	—	17	—	136	—	11,5—24,7	16,8	—
Pyrimal	20	11	126	148	+ 17	16,3—43,6	26,1	+ 55
p-Aminobenzoesäure	250	8	135	133	— 1	20,7—52,9	33,2	+ 98
Pyrimal + p-Aminobenzoesäure	20 / 250	9	115	124	+ 8	27,7—41,6	32,7	+ 95

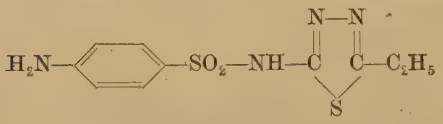
Von einer 24stündigen *Streptococcus Aronson*-Kultur wurde 1 Normalöse (1,5 mm innerer ⌀) in 2,0 cm³ Bouillon suspendiert. Hiervon ausgehend wurden nacheinander 5 weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:10 hergestellt (0,2 ad 2,0 cm³), 0,2 cm³ der letzten Verdünnung entsprachen dann einer relativen Keimzahl von 10^{-6} Normalöse. Jede Maus wurde mit 0,2 cm³ der letzten Verdünnung intraperitoneal infiziert. 2 Stunden nach der Infektion setzte die perorale Behandlung ein. Insgesamt wurden 3 Behandlungen im Abstand von 24 Stunden durchgeführt.

Die Prüfungen hatten bezüglich der bakteriostatischen Wirksamkeit von Thioharnstoff und Thiouracil ein negatives Resultat (s. Tabelle 5). Pyrimal wirkte vergleichsweise gut. Thioharnstoff erwies sich auch in der 3fachen Dosierung als wirkungslos. Die Toxizitätsgrenze war nach einigen Vorversuchen anscheinend noch nicht erreicht. Auch Thiouracil heilte in der doppelten Menge die infizierten Mäuse nicht, jedoch näherte man sich hier auch schon der Toxizitätsgrenze für Thiouracil.

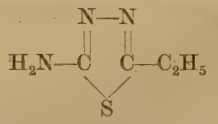
Tabelle 5. *Prüfung der bakteriostatischen Wirksamkeit von Thioharnstoff und Thiouracil im Vergleich zu Pyrimal an der infizierten Maus.*

Präparat	Dosierung mg je 20 g Maus		Anzahl der Tiere	Es leben am					
	Einzeldosis	Gesamtdosis		1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	10. Tag
Infizierte Tiere.									
Pyrimal	5	15	10	10	10	10	10	10	8
Thioharnstoff	10	30	10	9	1	1	0	0	0
Thiouracil	5	15	10	9	1	0	0	0	0
Kontrollen	—	—	10	7	0	0	0	0	0
Nicht infizierte Tiere.									
Thioharnstoff	10	30	10	10	9	8	7	7	6
Thiouracil	5	15	10	10	9	9	8	7	4
Nicht infizierte und unbehandelte Tiere.									
—	—	—	20	—	—	—	—	—	13

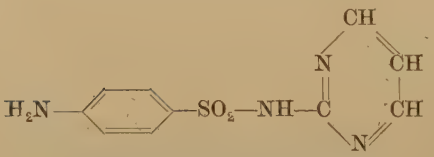
5. Die Wirkung von 2-Amino 5-äthylthiodiazol und 2-Aminopyrimidin. Zu den thyreostatisch wirksamen Sulfonamiden gehören (s. Tabelle 1 und Abb. 2) unter anderen das Globucid und das Pyrimal.



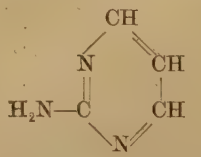
2-(p-Aminobenzolsulfonamido)-5-äthylthiodiazol = Globucid



2-Amino 5-äthylthiodiazol



2-(p-Aminobenzolsulfonamido)-pyrimidin = Pyrimal (Debenal)



2-Aminopyrimidin

Da wir das einfache Sulfanilamid bei einer Tagesdosis von 35 mg je 100 g Körpergewicht in thyreostatischer Hinsicht unwirksam fanden, während sich Globucid mit 30 mg, Pyrimal mit 20 mg, als aktiv erwiesen, so war es interessant, einmal zu prüfen, ob diese Wirkung der beiden Sulfonamide dem Molekül als Ganzes zukommt, oder ob eventuell schon die heterozyklischen Ringe selbst schilddrüsenwirksam sind. Wir haben Versuche mit 2-Amino 5-äthylthiodiazol und 2-Aminopyrimidin durchgeführt (s. die obenstehenden chemischen Formeln). Die Resultate der Versuche finden sich in Tabelle 6.

Zu diesen Prüfungen haben wir schwerere Ratten als zu den früheren Versuchen heranziehen müssen. Für unbehandelte Tiere dieser Gewichtsklasse

Tabelle 6. *Die Wirkung von 2-Amino-5-Äthylthiodiazol und 2-Aminopyrimidin auf das Schilddrüsengewicht nach 10tägiger peroraler Verabreichung* (Mittelwerte).

Präparat	Dosis cm³ mg/100 g Körpergewicht täglich	Tierzahl	Körpergewicht Anfang	Körpergewicht Ende	Δ Körpergewicht in %	Niedrigstes und höchstes Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Durchschnittliches Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Δ Schilddrüsengewicht in %	
								a	b
Unbehandelt . .	—	6	—	232	—	12,1—17,6	14,9	—	—
1,3% Agar-Agar	0,5 cm³	5	202	203	+ 1	10,2—12,7	11,8	—	— 21
2-Amino-5-Äthylthiodiazol in 1,3% Agar-Agar	50 mg	4	195	198	+ 2	16,7—27,2	22,1	+ 87	+ 48
2-Aminopyrimidin in 1,3% Agar-Agar	50 mg	4	216	175	— 19	14,2—16,1	14,9	+ 26	0

In der letzten Spalte sind die a-Werte auf den Wert 11,8, die b-Werte auf den Wert 14,9 bezogen. Δ = Differenz (Mittelwerte).

fanden wir im Durchschnitt ein Schilddrüsengewicht von 14,9 mg je 100 g Körpergewicht. Außerdem haben wir hier ein anderes Mucilaginosum ausprobiert, den Agar-Agar, der sich zur Herstellung stabiler Suspensionen gut bewährte. Eine 1,3%ige heiße wäßrige Lösung wurde auf der Schüttelmaschine bis zum Erkalten geschüttelt.

Tiere, die nur Agar-Agar bekamen, wiesen kleinere Schilddrüsen als völlig unbehandelte Ratten auf. Dies führen wir auf den Jodgehalt des Agar-Agar zurück, dessen Verwendungsbereich bei manchen Schilddrüsenversuchen dadurch eingeschränkt wird. Was nun die Wirkung der beiden geprüften Heterozyklen betrifft, so zeigt Tabelle 6, daß das 2-Amino-5-äthylthiodiazol stark auf die Schilddrüse wirkte, während das vom 2-Aminopyrimidin nicht gesagt werden kann. Die wichtigeren Vergleichszahlen sind ohne Zweifel die in der letzten Spalte unter a genannten.

6. Die Wirkung bisher geprüfter Substanzen auf weitere Organe. Es schien uns wichtig, einmal der Frage nachzugehen, ob die Schilddrüse das einzige Organ ist, das sich unter dem Einfluß von Rhodankalium, Thioharnstoff, Thiouracil, einiger Sulfonamide und des Diaminodiphenylsulfons so stark verändert. Das nächstliegende war, die Gewichtsveränderungen verschiedener Organe zu messen. Von den innersekretorischen Organen haben wir (außer den Schilddrüsen) die Sexualdrüsen und die unter ihrem direkten Einfluß stehenden Geschlechtsorgane, die Nebennieren und die Hypophysen einer näheren Betrachtung unterzogen. Das Pankreas ließ sich bei den Ratten schwer abgrenzen und somit nicht exakt wiegen. Außer den genannten Organen wurden noch Leber-, Milz- und Nierengewichte ermittelt.

Um das Verhalten der schilddrüsenwirksamen Substanzen gegenüber anderen Organen beurteilen zu können, haben wir zum Vergleich bei 6 weiblichen und 5 männlichen unbehandelten Ratten derselben Gewichtsklasse wie die Versuchstiere die Gewichte der uns interessierenden Organe ermittelt *. Zu- bzw. Abnahme der Organgewichte in den einzelnen Versuchsserien sind auf diese durchschnittlichen Normalwerte bezogen. Da es sich bei diesen Übersichten um die weitere Auswertung der gleichen, schon in den Tabellen 1, 2 und 4 aufgeführten Versuche handelt, so sind die Dosierungsangaben nicht wiederholt worden. Wir verweisen auf die genannten Tabellen.

Diaminodiphenylsulfon (in der niedrigeren Dosierung von 3,5 mg) und Cibazol führten zu keiner oder höchstens einer fraglichen Zunahme des Schilddrüsengewichtes. Auch die Mehrzahl der übrigen Organe zeigten Gewichte, die von den Normalwerten nicht wesentlich abwichen. Lediglich Hoden und die Milz bei den mit 3,5 mg Diaminodiphenylsulfon zeigten stärkere Gewichtszunahmen, doch handelt es sich hier um Einzelbefunde auf die man deswegen einstweilen keinen großen Wert legen wird.

Gegenüber der beträchtlichen Gewichtsvermehrung der Schilddrüsen, welche in allen Fällen bei den schilddrüsenwirksamen Stoffen festzustellen war, waren bei allen anderen untersuchten Organen Gewichtszu- und -abnahmen zu verzeichnen. In einigen Fällen hat man jedoch den Eindruck, daß Abweichungen in einer bestimmten Richtung vorherrschen. So bei den Ovarien, dem Uterus, der Prostata, der Milz, bei denen vorwiegend Gewichtsabnahmen gefunden wurden. Umgekehrt verhielten sich Hypophyse, Leber und Nieren, bei denen die Gewichtszunahmen vorherrschten. Die noch übrigen Organe, darunter die Nebennieren, boten ein wechselndes Verhalten. In gar keinem Fall aber sind Gewichtszu- oder -abnahmen gefunden worden, die mit dem Ausmaß der Gewichtsveränderung der Schilddrüsen verglichen werden könnten. Die Schilddrüsen nehmen in den geschilderten Versuchen also eine Sonderstellung ein, was sich deutlich aus Tabelle 7 ergibt.

Wir haben noch einige Feststellungen über die Organgewichtsverhältnisse bei einigen Einzelfällen gemacht, die durch eine stärkere Körpergewichtsabnahme der Versuchstiere gekennzeichnet sind; es handelt sich um die bei den genannten Versuchsserien jeweils am stärksten aufgetretenen Körpergewichtsabnahmen. Diese sind — und das trifft vor allem für das Rhodankalium, den Thioharnstoff, das Thiouracil und das Diaminodiphenylsulfon zu — als Ausdruck einer Toxizität der Präparate in den gewählten Dosen anzusehen. Da nun alle

* Die ausführlichen Tabellen können auf Wunsch zur Einsicht übersandt werden.

Tabelle 7. *Abweichungen der Organgewichte von der Norm* (Gewichtprozent) *bei Behandlung weiblicher und männlicher Ratten mit thyreostatischen Substanzen.* Untere und obere Grenzwerte 4—12 bzw. 3—7.

Organ	Rattenweibchen	Rattenmännchen
Schilddrüse	+ 73 bis + 181	+ 64 bis + 192
Ovarien	— 55 bis + 24	—
Uterus	— 70 bis + 40	—
Hoden	—	— 21 bis + 30
Prostata	—	— 46 bis 0
Samenblasen	—	— 47 bis + 49
Nebennieren	— 17 bis + 25	— 12 bis + 39
Hypophyse	— 8 bis + 21	0 bis + 33
Leber	— 4 bis + 19	+ 3 bis + 26
Milz	— 39 bis + 57	— 30 bis + 2
Nieren	+ 2 bis + 35	+ 9 bis + 25

Schilddrüsengewichte immer auf 100 g Körpergewicht umgerechnet wurden, so mußte zu der Frage Stellung genommen werden, wieweit in Fällen von stärkeren Körpergewichtsabnahmen der Versuchstiere eine Zunahme des Schilddrüsengewichts als reell anzusehen ist und ob hier nicht durch eine einfache Rechenoperation relativ zu hohe Schilddrüsengewichte angegeben worden sind; denn es war ja mit der Möglichkeit zu rechnen, daß bei den verhältnismäßig doch kurzfristigen Versuchen die Schilddrüsen ihr Gewicht nicht im gleichen prozentualen Ausmaß wie das Gesamtkörpergewicht reduzieren. Diese Überlegungen mußten dann aber auch für andere insbesondere andere innersekretorische Organe zutreffen, und man hat also durch den Vergleich der Organgewichts*reaktionen* bei stärkerer Körpergewichtsabnahme des Versuchstieres die Möglichkeit zu entscheiden, ob die hier ja im Vordergrund des Interesses stehende Schilddrüsenreaktion reell ist oder nicht. Die Ergebnisse an solchen Einzeltieren lassen nun keinen Zweifel darüber, daß die Richtung der Veränderung an den Schilddrüsen der Versuchstiere, d. h. die Zunahme des Gewichts, eine reelle Erscheinung ist. Bindendere Zahlenangaben erhält man jedoch, wenn man in künftigen Versuchen durch Wahl niedriger Dosen stärkere Körpergewichtsabnahmen bei den Versuchstieren vermeidet.

7. Die Wirkung von Thioharnstoff und östrogenem Stilben. Bei dem Zustandekommen der Gewichtsvermehrung der Schilddrüsen spielt, worauf wir noch zu sprechen kommen, die Hypophyse eine wichtige Rolle. Unter dem indirekten Einfluß der thyreostatischen Substanzen schüttet sie vermehrt thyreotropes Hormon aus, das einen stark anregenden Reiz auf die Schilddrüsen ausübt. Nun ist es infolge der bestehenden Wechselwirkung zwischen Hypophysenvorderlappen und Schilddrüse ja möglich, durch Verabreichung von Schilddrüsenhormon die Ausschüttung des thyreotropen Hormons zu unterbinden.

Tabelle 8. *Die Wirkung von Thioharnstoff und Cyren A auf das Schilddrüsengewicht. 14tägiger Versuch* (Mittelwerte).

Präparat	Dosis mg/100 g Körpergewicht täglich	Tierzahl	Körpergewicht Anfang	Körpergewicht Ende	Δ Körpergewicht in %	Niedrigstes und höchstes Schilddrüsengewicht mg/100 g Körpergewicht Ende	Durchschnittliches Schilddrüsengewicht		Schilddrüsengewicht in %	
							mg/100 g Körpergewicht Ende	mg/100 g Körpergewicht Anfang	mg/100 g Körpergewicht Ende	mg/100 g Körpergewicht Anfang
Unbehandelt	—	17	—	136	—	11,5—24,7	16,8	16,8	—	—
Thioharnstoff . . .	50	5	117	112	— 4	30,2—50	40,3	39,3	+140[1]	+134[1]
Cyren A . .	25[1]	5	105	100	— 5	11,5—14,7	13,2	12,7	+ 21[1]	— 24[1]
Cyren A + Thioharnstoff . . .	25[1] / 50	5	116	85	—27	31,4—39,5	35,9	26,2	+172[2]	+106[3]

[1] Bezogen auf 16,8. [2] Bezogen auf 13,2. [3] Bezogen auf 12,7.

Tabelle 9. *Die Wirkung von Thioharnstoff und Cyren A auf die Gewichte der Sexualorgane und einiger weiterer Organe.*
Ergänzung zu Tabelle 8. Näheres s. dort. n = Anzahl der Tiere.

Organ	Unbehandelt, n=6♀, 5♂	Thioharnstoff, n=2♀, 3♂		Cyren A, n=3♀, 2♂		Thioharnstoff + Cyren A, n=2♀, 3♂			
	mg/100g Körpergewicht Ende	mg/100g Körpergewicht Ende	Gewicht %	mg/100g Körpergewicht Ende	Gewicht %	mg/100g Körpergewicht Ende	Gewicht %	mg/100g Körpergewicht Anfang	Gewicht %
Ovarien	40,3	22,5	— 44	40,0	— 1	39,1	— 3	28,0	— 31
Uterus	132,0	59,6	— 55	239,0	+ 81	278,0	+ 111	199,0	+ 51
Hoden	1170,0	1515,0	+ 29	533,0	— 55	520,0	— 56	386,0	— 67
Prostata . . .	162,0	113,0	— 30	16,9	— 90	31,8	— 80	23,7	— 85
Samenblasen .	241,0	127,0	— 47	44,8	— 81	33,2	— 86	25,1	— 90
Hypophyse ♀ .	5,3	4.8	— 9	10,8	+ 104	16,5	+ 212	11,8	+ 123
♂ .	4,0	5,5	+ 37	8,8	+ 120	13,3	+ 232	9,9	+ 145
Nebennieren ♀	34,6	35,2	+ 2	46,8	+ 35	56,0	+ 62	40,1	+ 16
♂	22,8	26,0	+ 14	42,8	+ 88	60,6	+ 165	45,5	+ 87
Leber[1]	5190,0	5650,0	+ 9	7350,0	+ 42	8440,0	+ 63	6172	+ 19
Milz[1]	550,0	415,0	— 25	570,0	+ 4	427,0	— 22	314	+ 43
Nieren[1]	900,0	1042,0	+ 16	935,0	+ 4	1220,0	+ 36	901	— 0

[1] Mittelwerte ohne Unterschied des Geschlechts berechnet.

Es ist weiter auch bekannt, daß man durch östrogenes Hormon in hohen Dosen die thyreotrope Aktivität des Hypophysenvorderlappens dämpfen kann[25–27]. Hiervon ausgehend haben wir uns gefragt, ob es auch möglich ist, die nach Verabreichung des Thioharnstoffs von der Theorie geforderte Ausschüttung des thyreotropen Hormons aus dem Vorderlappen der Hypophyse durch hohe Östrogendosen zu unterdrücken.

Als Östrogen verwendeten wir Dioxydiäthylstilben (Cyren A), einen synthetischen Stoff mit allen Eigenschaften des natürlichen Follikelhormons[28]. Von diesem Östrogen standen uns zylindrisch geformte Minen von 25 mg Gewicht zur Verfügung, die wir 10 Ratten unter die Nackenhaut implantierten. Fünf dieser Tiere blieben sonst unbehandelt, die 5 anderen Tiere erhielten täglich Thioharnstoff. Weitere 5 Ratten, bei denen keine Cyren-A-Implantation vorgenommen wurde, bekamen nur Thioharnstoff.

Die Resultate sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Sieht man sich die auf 100 g Körpergewicht berechneten Schilddrüsengewichte (viertletzte Spalte) an, so wird man feststellen, daß es nicht gelungen ist, durch Cyren A die Thioharnstoffwirkung auf die Schilddrüse aufzuheben. Zwar ist das Schilddrüsengewicht bei den mit Thioharnstoff + Cyren A behandelten Ratten etwas niedriger als das der nur mit Thioharnstoff gefütterten Tiere. Aber man muß berücksichtigen, daß schon Cyren A allein (ähnlich wie Jod, s. Tabelle 2 und 3) eine Verkleinerung der Schilddrüsen herbeigeführt hat. Bildet man zwischen den beiden oberen und den beiden unteren Zahlen die Differenz, so ergeben sich für die Gewichtszunahmen der Schilddrüsen die Werte +23,5 bzw. +22,7 mg. Prozentual ausgedrückt hatten damit die Schilddrüsen der Thioharnstoffserie um 140% (verglichen mit den Schilddrüsen der unbehandelten Tiere) zugenommen, und die Schilddrüsen der Cyren A + Thioharnstoffserie waren um 172% schwerer als die der Cyren-A-Serie.

Gegen diese Betrachtung ließ sich einwenden, daß bei der Thioharnstoff- + Cyrenbehandlung die Tiere aber um sehr viel mehr an Körpergewicht verloren hatten als die Tiere der übrigen Versuchsserien, daß somit ein Vergleich der verschiedenen Reihen untereinander schwierig sei. Wie schon unter 6. ausgeführt, könnten bei Rattenmit starker Körpergewichtsabnahme relativ zu hohe Schilddrüsengewichte vorgetäuscht werden. Wir haben nun die gefundenen Schilddrüsengewichte auch auf das Körper*anfangs*gewicht bezogen und dabei die in der drittletzten Spalte angegebenen Werte erhalten. Die absoluten Gewichtszunahmen für die Schilddrüsen betrugen danach +22,5 bzw. +13,5 mg, was einem prozentualen Anstieg von 134% bzw. 106% entspricht. Wiederum zeigte sich also, daß bei der cyren-A-freien Serie einerseits und der Cyren-A-Serie andererseits der Thioharnstoffeffekt praktisch derselbe ist. Zu diesem Resultat gelangt man also, einerlei, ob man die tatsächlich gemessenen Schilddrüsengewichte auf das Körperend- oder -anfangsgewicht bezieht, so daß also unterschiedliche Körpergewichtsveränderungen bei den verschiedenen Versuchsserien hier nicht von wesentlicher Bedeutung für das Resultat sein können.

Daß das Cyren A in unseren Versuchen (wie nicht anders erwartet wurde) aber bis zur Hypophyse gelangt ist, dort auf den Vorderlappen, und zwar auf seine *gonadotrope* Tätigkeit hemmend eingewirkt hat,

ergibt sich aus Tabelle 9. Die dort genannten Gewichtsreduktionen von Hoden, Prostata und Samenblasen sind ein Beweis dafür, denn diese „antimaskuline" Wirkung des Östrogens ist keine direkte, sondern wird unter Einschaltung des Hypophysenvorderlappens hervorgerufen[29]. Die Ovargewichte waren unverändert, die Uterusgewichte infolge der direkten Einwirkung des Östrogens erheblich erhöht.

Der untere Teil der Tabelle 9 enthält noch Angaben über weitere Organe und ihre Gewichtsveränderungen unter dem Einfluß einer Behandlung mit Thioharnstoff, Cyren A oder beiden Stoffen zusammen. In der Tabelle treten vor allem die an sich bekannten Gewichtszunahmen der Hypophysen und der Nebennieren in der Cyren-A- und der Thioharnstoff- + Cyren-A-Reihe hervor. Ob die besonders hohen, auf das Körperendgewicht berechneten Werte nach der kombinierten Behandlung der Tiere reell sind, muß bezweifelt werden. Die Unterschiede verwischten sich, wenn man die Organgewichte auf das Körperanfangsgewicht bezog. Rechnete man in den Thioharnstoff- und Cyren-A-Serien die Organgewichte entsprechend auf das Körperanfangsgewicht um, so ergaben sich hier um höchstens 8% von den eingetragenen Δ-Gewichtsprozentwerten abweichende Zahlen, weshalb diese Zahlen nicht einzeln in der Tabelle 9 aufgenommen worden sind.

Diskussion.

Wir verfolgten mit unseren Versuchen das Ziel, einen möglichst breiten Überblick über das von amerikanischen Forschern angeregte Thema der thyreostatischen Substanzen zu gewinnen. Da uns nur eine nicht allzugroße Anzahl von Tieren zur Verfügung stand, so sind einige wichtige Fragen, die, soweit wir wissen, auch von den Amerikanern noch offen gelassen worden sind, vorerst auf Grund der vorliegenden Versuche nicht zu entscheiden. Wir sind zur Zeit mit der Bearbeitung einzelner solcher Fragen unter Heranziehung einer größeren Anzahl von Tieren beschäftigt.

So ist es sicherlich wichtig zu wissen, in welche Anordnung man die bekanntesten Sulfonamide zu bringen hat, wenn man ihre Wirkung auf die Schilddrüse zugrunde legt. Daß der Grundkörper, das Sulfanilamid (Prontalbin) am schwächsten wirkt, wird sich unseres Erachtens wohl auch weiterhin bestätigen. Auch die Stellung des Diaminodiphenylsulfons an der Wirkungsspitze der geprüften bakteriostatischen Substanzen wird sich kaum noch ändern. Dagegen wollen wir bezüglich der Wirkungsstärke der übrigen Sulfonamide nicht unbedingt an der in der Tabelle 1 oder der Abb. 2 gewählten Anordnung festhalten. Jedenfalls — und darauf kam es uns in erster Linie an — haben wir die Angabe der thyreostatischen Wirksamkeit einer Reihe von Sulfonamiden bestätigt gefunden. Darüber hinaus haben wir zeigen

können, daß die thyreostatische Wirksamkeit einiger Sulfonamide nicht auf das Molekül als Ganzes bezogen werden muß. Am Beispiel des Globucids ist uns der Nachweis gelungen, daß nicht nur dieses selbst, sondern auch der im Globucidmolekül gebundene, substituierte Thiodiazolring, wenn man diesen ungebunden als 2-Amino 5-äthylthiodiazol anwendet, thyreostatisch wirksam ist. Entsprechende Versuche mit Pyrimal (Debenal) bzw. 2-Aminopyrimidin verliefen bezüglich der thyreostatischen Wirksamkeit des zweitgenannten Stoffes negativ.

Wie wir eben schon erwähnten, gehört das z. B. im Mäusetherapieversuch so hoch wirksame Diaminodiphenylsulfon auch zu den stark thyreostatisch wirksamen Stoffen, und es war gerade dieser bedeutende Unterschied zwischen der bakteriostatischen und der thyreostatischen Wirksamkeit des Diaminodiphenylsulfons und etwa des Sulfanilamids, der die Frage hat aufkommen lassen, ob zwischen der bakteriostatischen und der thyreostatischen Wirkung irgendeine engere Beziehung besteht. Bejahendenfalls würde man dann am ehesten an eine Ähnlichkeit im Fermentchemismus der Bakterien- bzw. der Follikelzelle der Schilddrüse denken, der durch die Sulfonamide bzw. das Diaminodiphenylsulfon gestört wird. Da nach unseren Versuchen an der mit Streptococcus Aronson infizierten Maus den stark thyreostatisch wirksamen Stoffen Thioharnstoff und Thiouracil aber keine bakteriostatische Wirkung zukommt, so kann eine Ähnlichkeit im Fermentchemismus höchstens noch innerhalb der Reihe der bakteriostatischen Substanzen gesucht werden. Hierzu bedarf es weiterer Versuche.

In diesem Zusammenhang hatten wir auch die Experimente mit p-Aminobenzoesäure aufgenommen. p-Aminobenzoesäure ist imstande, die bakteriostatische Wirkung der Sulfonamide aufzuheben. Dieser Effekt beruht darauf, daß die p-Aminobenzoesäure für die (oder viele) Bakterien ein lebensnotwendiges Vitamin darstellt, das nach der heute vorherrschenden Theorie die chemisch sehr ähnlich gebauten Sulfonamide von ihrer Haftstelle im Zelleib des Bakteriums verdrängt, ebenso wie umgekehrt die p-Aminobenzoesäure durch die Sulfonamide verdrängt werden kann. Die Bakterienzelle vermag also zwischen p-Aminobenzoesäure und Sulfonamid nicht zu unterscheiden, beide Substanzen „haften", und zwar immer diejenige stärker, die in der höheren Konzentration vorliegt bzw. angeboten wird. Da aber *nur* die p-Aminobenzoesäure als Vitamin zu wirken vermag, so resultiert daraus das Weiterwachsen der Keime bei Anwesenheit von p-Aminobenzoesäure, der Wachstumsstillstand bei Gegenwart von Sulfonamid.

Diese theoretischen Vorstellungen haben uns veranlaßt, zu prüfen, ob auch die p-Aminobenzoesäure genau so wie eine Anzahl von Sulfonamiden und Diaminodiphenylsulfon in der Follikelzelle der Schilddrüse eine Haftstelle findet und damit ebenfalls thyreostatisch wirkt.

An eine *Aufhebung* der Sulfonamidwirkung war hier weniger zu denken, da ja, soweit man heute weiß, die p-Aminobenzoesäure nur für die Bakterienzelle nicht aber für die Zellen des höher entwickelten Tieres ein das Leben erhaltendes und förderndes, notwendiges Vitamin darstellt. Unsere Versuche haben gezeigt, daß auch die p-Aminobenzoesäure in hohen Dosen thyreostatisch wirkt.

Im Hinblick auf die weite Verbreitung der Sulfonamidtherapie bei den verschiedenen Infektionskrankheiten muß die Frage auftauchen, ob man bei den heute üblichen Sulfonamiddosen mit einer Nebenwirkung auf die Schilddrüse, d. h. mit einem thyreostatischen Effekt beim Menschen zu rechnen hat. Die Entwicklung der Sulfonamidtherapie hat einen solchen Verlauf genommen, daß man in den letzten Jahren zu immer höheren Dosen zur Erzielung gleich guter Resultate hat greifen müssen. In der Leipziger Dermatologischen Klinik sind z. B. bei Gonorrhoe, selbstverständlich nur dann, wenn es sich als nötig erwies, und dann oft mit dem erwünschten Erfolg, 70,0 g Globucid in 5 Tagen verabreicht worden. Das entspricht bei einem Körpergewicht von 70 kg einer Tagesdosis von 20 mg/100 g, diese Menge 5 Tage lang gegeben. Bei unseren Rattenversuchen sahen wir bei 14tägiger Gabe von täglich 20—50 mg je 100 g Körpergewicht deutliche thyreostatische Effekte. Läßt man hier eine Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen zu, so läßt sich abschätzen, daß man bei einer Gesamtdosis von 70 g Globucid noch nicht mit thyreostatischen Effekten beim Menschen zu rechnen hat. Zur weiteren Klärung dieser Frage müssen noch Tierversuche zur Ermittlung der Schwellenkonzentration für die thyreostatische Wirkung durchgeführt werden. In Anbetracht der Tatsache, daß die Sulfonamide überhaupt eine thyreostatische Wirkung entfalten können, wird es aber auch wichtig sein, jetzt schon diesbezügliche Erfahrungen am Menschen zu sammeln. Am nächstliegenden wären hier Untersuchungen über den Grundumsatz beim gesunden Menschen unter dem Einfluß von Sulfonamiden, worüber wir in der Literatur[30] keine Angaben fanden.

Stärker als die Sulfonamide wirken Rhodankalium, Thioharnstoff und Thiouracil auf die Schilddrüsen. Bei einer Dosierung von 40 bis 50 mg je 100 g Körpergewicht wurden im 14tägigen Versuch Gewichtssteigerungen der Schilddrüsen um 100—200% im Durchschnitt erzielt. Welche von den drei genannten Substanzen an die Spitze zu stellen ist, können wir auf Grund unserer bisherigen Versuche nicht entscheiden. Auch hier haben wir uns zunächst mehr auf orientierende Experimente beschränkt. Daß hier aber besonders wirksame Stoffe vorliegen, kann wohl kaum durch zahlenmäßig umfangreiche Untersuchungen in Frage gestellt werden. Auch die Ergebnisse der Versuche mit Rhodankalium und Thioharnstoff bei gleichzeitiger Verabreichung von Jodkalium

oder von Schilddrüsenhormon sind trotz der kleinen Zahl von Tieren in jeder Versuchsgruppe so einheitlich ausgefallen und haben zum Teil so starke Unterschiede in den verschiedenen Gruppen gebracht, daß wir nicht annehmen können, daß sich bei ausgedehnteren Experimenten andere Resultate erzielen lassen würden. Von diesen Versuchen ist es wichtig, festzuhalten, daß Schilddrüsenhormon (Elityran, Thyroxin) sowie jodiertes Kasein (Elityran K) in der Lage sind, die Schilddrüsenvergrößerung, wie sie nach alleiniger Rhodankalium- oder Thioharnstoffzufuhr mit Sicherheit eintreten, zu unterdrücken. Mit Jodkalium gelingt dies, wie schon amerikanische Forscher gefunden haben, nur im Thioharnstoff- nicht aber im Rhodankaliumversuch. Rawson, Hertz und Means[31] beschreiben einen ähnlichen Rhodankalium-Jodkaliumversuch mit dem gleichen Resultat am Menschen. Wir kommen hierauf bei der Besprechung des Wirkungsmechanismus der thyreostatischen Substanzen noch einmal zurück.

In allen unseren Betrachtungen war immer die Gewichtszunahme des auf 100 g Körperendgewicht berechneten Schilddrüsengewichtes für die Schlußfolgerung wesentlich. Man muß sich nun auch die Frage vorlegen, worauf, substanzmäßig gesehen, diese Gewichtszunahme, die Kropfbildung, beruht. Diese Frage kann nur im Zusammenhang mit den histologischen Veränderungen der Schilddrüsen der Versuchstiere gegenüber den Kontrolltieren diskutiert werden, über die später von anderer Seite berichtet werden wird.

Bei den engen Beziehungen, die zwischen den endokrinen Organen untereinander, insbesondere auch zwischen diesen und der Schilddrüse bestehen, muß man sich nach Kenntnis der Wirkung der thyreostatischen Stoffe fragen, welche indirekten Wirkungen diese Stoffe auf die übrigen innersekretorischen Drüsen und auch welche Wirkungen überhaupt auf andere Organe festzustellen sind. Die Behandlung mit einer der thyreostatisch wirksamen Verbindungen gleicht einer Thyreoidektomie, jedenfalls insofern, als ebenso wie nach operativer Schilddrüsenentfernung nach Anwendung der chemischen Methode die wesentlichste Leistung der Thyreoidea, die Thyroxinbildung, unterbleibt. Machen sich nun bei den mit Hilfe der thyreostatischen Stoffe ausgeschalteten Schilddrüsen die gleichen Ausfallserscheinungen an den übrigen Organen wie nach Thyreoidektomie geltend? Unsere Gewichtsbestimmungen an verschiedenen Organen weiblicher und männlicher Versuchstiere hatten ergeben, daß bei den Ovarien, dem Uterus, der Prostata und der Milz der mit thyreostatisch wirksamen Stoffen behandelten Versuchstiere so überwiegend bzw. ausschließlich Gewichtsabnahmen auftraten, daß man — trotz der kleinen Anzahl von Tieren in den verschiedenen Gruppen — daran nicht vorbeigehen kann. Ebenso fanden wir ganz überwiegend mehr oder weniger große Gewichts-

zunahmen der Leber und der Nieren. Auch bei den Hypophysen waren die Ausschläge nach der Seite der Gewichtszunahmen häufiger und größer als die nach der Seite der Gewichtsabnahmen. Bei Hoden, Samenblasen und Nebennieren waren ebenso große Gewichtszu- und -abnahmen zu verzeichnen.

Über histologische Veränderungen an diesen übrigen Organen wird später von anderer Seite berichtet werden. Erst wenn diese Befunde vorliegen, lassen sich exaktere Aussagen über die endokrine Rückwirkung der von uns nachgewiesenen Schilddrüsenvergrößerungen und das Wesen der an den Organen gefundenen Gewichtsveränderungen machen.

Zusammenfassung.

In Bestätigung und Erweiterung jüngster amerikanischer Arbeiten wurde gefunden:

1. Rhodankalium, Thioharnstoff, Thiouracil sowie eine Anzahl von Sulfonamiden wirken thyreostatisch, d. h. hemmend auf die Thyroxinbildung in der Schilddrüse. Dabei vergrößern sich die Schilddrüsen bis um das Vierfache ihres Anfangsgewichtes, d. h. es tritt Kropfbildung auf. Histologisch bieten die hyperplastischen Drüsen eine basedowartige Struktur.

2. Kleinste Mengen Jodkalium verhindern die durch Rhodankalium ausgelöste Kropfbildung, desgleichen Thyroxin. Dagegen gelingt es beim Thioharnstoffkropf nur durch Thyroxin (bzw. Schilddrüsenextrakt oder jodiertes Kasein), nicht aber durch Jodkalium, die Kropfbildung zu unterdrücken.

3. Außer Sulfonamiden wirkt auch die bakteriostatisch hoch wirksame Verbindung Diaminodiphenylsulfon stark thyreostatisch.

4. Es besteht aber (zumindest keine allgemeingültige) Beziehung zwischen bakteriostatischer und thyreostatischer Wirkung. Thioharnstoff und Thiouracil sind im Therapieversuch an der mit Streptococcus Aronson infizierten Maus bakteriostatisch unwirksam.

5. Auch p-Aminobenzoesäure wirkt thyreostatisch und damit strumigen.

6. Die thyreostatische Wirksamkeit der Sulfonamide ist nicht immer auf das ganze Molekül zu beziehen. So konnte z. B. festgestellt werden, daß nicht nur Globucid sondern auch das im Molekül als Substituent vorhandene 2-Amino-5-Äthylthiodiazol thyreostatisch wirksam ist. Dagegen erwies sich das 2-Aminopyrimidin, ein Substituent im Pyrimal (Debenal) als thyreostatisch unwirksam.

7. Die thyreostatischen Substanzen wirken ganz überwiegend auf die Schilddrüsen ein, die, wie gesagt, hyperplastisch werden. Weit zurück stehen die beobachteten Gewichtszunahmen bei der Leber und

den Nieren. Die Hypophysen zeigen häufiger Ausschläge nach der Seite der Gewichtszunahmen, als solche nach der Seite der Gewichtsabnahmen. Ovarien, Uterus, Prostata und Milz sind verkleinert. Ganz wechselnde Gewichtsveränderungen finden sich bei den Hoden, Samenblasen und den Nebennieren.

8. Implantiertes Stilboestrol (Cyren A) vermag die Entstehung eines Thioharnstoffkropfes nicht zu verhindern.

Literatur.

[1] Richter, C. P. and K. H. Clisby: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am). **48**, 684 (1941). — [2] Kennedy, T. H.: Nature (Brit.) **150**, 233 (1942). — [3] MacKenzic, J. B., MacKenzic, C. G. and E. V. McCollum: Science (N. Y.) **94**, 518 (1941). [4] MacKenzic, C. G. and J. V. MacKenzic: Endocrinology (Am.) **32**, 185 (1943). — [5] Astwood, E. B.: J. Pharmacol. (Am.) **78**, 79 (1943). — [6] Astwood, E. B., J. Sullivan, A. Bissell and R. Tyslowitz: Endocrinology (Am.) **32**, 210 (1943). — [7] Astwood, E. B.: J. amer. med. Assoc. **122**, 78 (1943). — [8] Williams and Bissell: Science (N.Y.) **98**, 156 (1943). — [9] Himsworth: Lancet **1943**. — New Engld J. Med. **229**, 97 (1943); **1944**, 13. — [10] Freiesleben, Meulengracht u. a.: Ugeskr. Laeg. (Dän.) **1944**, Nr 35. — [11] Espensen u. Roholm: Ugeskr. Laeg. **1944**, Nr 35. — [12] Haler: Brit. med. J. **1944**, 382. — [13] Welshman: Lancet **1944**, 194. — [14] Newcomb: Lancet **1944**. — [15] Astwood, E. B. and A. Bissell: Endocrinology (Am.) **34**, 282 (1944). — [16] Hughes, A. M.: Endocrinology (Am.) **34**, 69 (1944). — [17] Rawson, R. W., J. F. Tannheimer and W. Peacock: Endocrinology (Am.) **24**, 245 (1944). — [18] Franklin, A. L., S. R. Lerner and J. L. Chaikoff: Endocrinology (Am.) **34**, 265 (1944). — [19] Schachner, H., A. L. Franklin and J. L. Chaikoff: Endocrinology (Am.) **34**, 159 (1944). — [20] Baumann, E. J., N. Metzger and D. Marine: Endocrinology (Am.) **34**, 44 (1944). — [21] Dempsey, E. W.: Endocrinology (Am.) **34**, 27 (1944). — [22] Wagner-Jauregg, Th. u. E. Schreiber: Biochem. Z. **317**, 21 (1944). — [23] Isenschmid, R.: Erg. Physiol. **45**, 184 (1944). — [24] Romeis: Taschenbuch der mikroskopischen Technik. [25] Bialet-Laprida, Z.: C. r. Soc. Biol. **114**, 733 (1933). — [26] Okkels, H.: Klin. Wschr. **1936 II**, 1905. — [27] Grumbrecht, P. u. A. Loeser: Arch. exper. Path. (D.) **189**, 345 (1938). — [28] Huf, E.: Klin. Wschr. **1941**, Nr 29/30, 729, 755. — [29] Huf, E.: Klin. Wschr. **1942**, Nr 51, 1113. — [30] Domagk, G. u. C. Hegler: Chemotherapie bakterieller Infektionen. Leipzig: S. Hirzel 1944.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Eine neue Methode zum spezifischen biologischen Nachweis von Morphin im Harn an der Mäusepupille *.

Von

A. W. Forst und R. Deininger **.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Mai 1948.)

1. Teil.

Die chemischen Nachweismethoden.

I. Einleitung.

In Arbeiten der medizinischen Literatur, die sich mit dem Nachweis von Morphin in Körperflüssigkeiten oder Organen beschäftigen, wird häufig das Ziel erstrebt, bei Morphinsüchtigen den ungesetzlichen Gebrauch des Betäubungsmittels nachzuweisen, um in kriminellen Fällen eine sichere Handhabe zur Anordnung einer Entziehungskur zu besitzen. Der Harn, der jeweils das Morphin zu fassen gestattet, ist als „Belastungszeuge" stets verfügbar.

II. Der Morphinnachweis im Harn, unter Berücksichtigung des Schicksals von Morphin im tierischen und menschlichen Organismus, gemäß den bisherigen Kenntnissen.

Aus Anlaß des bekannten Prozesses in Paris gegen Dr. Castaing, den ersten Giftmörder, der sich eines Pflanzenalkaloides bediente, wurde zuerst die Aufmerksamkeit der Toxikologen auf das Morphin gelenkt. Dieser 27jährige Arzt, ehemaliger Schüler Orfilas, wurde im Jahre 1823 trotz Mangels eines chemischen Nachweises von Gift in der Leiche zum Tode verurteilt. Die Anklage war wegen Vergiftung mit essigsaurem Morphin gestellt worden. Die Obduktion ergab als hauptsächliche Erscheinung: „Kongestion der weichen Hirnmasse mit serösem Erguß zwischen den Hirnhäuten". Durch diesen konkreten Fall war die Anforderung an die Toxikologen und die forensische Chemie herangetreten, Methoden zum Nachweis von Pflanzenalkaloiden aufzufinden.

Die ersten Versuche veröffentlichte Orfila[1], der in der Königlichen Akademie der Medizin zu Paris im Januar 1824 ankündigte, es sei ihm gelungen, in einer Mischung von 1 Gran essigsaurem Morphin mit 4 Unzen Blut oder Urin von Hunden, dieses Salz in den beiden Flüssigkeiten nachzuweisen, dagegen wäre es ihm nicht möglich gewesen, die Gegenwart desselben Giftes im Blute dreier Hunde zu entdecken, die 12, 15 bis 18 Gran davon erhalten hatten, während es im Urin

* Herrn Prof. Dr. W. Heubner zum 70jährigen Geburtstag.

** Gekürzte Fassung der Dissertationsarbeit von R. Deininger.

eines dieser Tiere zu finden war. Lassaingne[2] folgerte aus Orfilas Ergebnissen, daß das Morphin im Blute entweder schnell zersetzt oder rasch ausgeschieden werde. Die heute noch vorherrschende Methode zur Auffindung der Alkaloide wurde von Stas[3] entwickelt. Sie beruht bekanntlich darauf, daß die Alkaloide infolge ihres basischen Charakters in organischen Lösungsmitteln, wie Äther, Chloroform, Essigester usw. löslich und in Wasser, dem etwas Alkali zugesetzt ist, unlöslich sind. Bei der Ausschüttelung eines mit Alkohol gewonnenen Extraktes in sodaalkalischer Lösung mit Äther gehen Alkaloide *mit Ausnahme des Morphins* in den Äther über. Morphin wird nach schwachem Ansäuern mit Salzsäure und Zusatz von Natriumbicarbonat mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand dieser Lösung wird durch eines der Alkaloidreagentien: Fröhde[4], Marquis[5], Pellagrie[6], Dennigès[7], Husemann[8] als Morphin identifiziert. Alle späteren Methoden bis zur Gegenwart sind aus dem Stasschen Verfahren hervorgegangen und unterscheiden sich nur durch das zum Ausschütteln der alkalischen Flüssigkeit verwendete organische Lösungsmittel.

Eine Modifikation des Stasschen Verfahrens wurde zuerst von Uslar und Erdmann[9] benützt und es gelang ihnen im Magen und Darm eines Kaninchens, welches 0,3 g salzsaures Morphin erhalten hatte, Morphin nachzuweisen.

An Hand des Stasschen Ausschüttelungsverfahrens begann nun ein eifriges Suchen nach dem Schicksal des Morphins im tierischen Organismus. Die Literatur füllt sich mit Vermutungen und Gegenvermutungen. So glaubte Cloetta[10], welcher sich der Erdmannschen Methode bediente, nicht an die Möglichkeit eines Nachweises von Morphin im Harn, sondern an eine im Organismus stattfindende Zersetzung des Morphins durch oxydative Prozesse.

Kausmann[11] dagegen konnte bei seinen zahlreichen Versuchen das Morphin immer mit großer Deutlichkeit im Harn nachweisen und zwar durch die Fröhdesche und Husemannsche Reaktion. Nach Marmè[12] läßt sich Morphin im Harn gesunder und kranker Menschen, wenn es in Dosen von mindestens 0,1 g intramuskulär oder subkutan verabreicht wird, in der Regel mit Sicherheit nachweisen, vorausgesetzt, daß die Nierenfunktion nicht alteriert ist. Bisweilen aber fand Marmè statt dessen in den Darmdejektionen einen Körper, der durch Fröhdes Reagenz nicht violett, sondern rein blau und dann grün usw. gefärbt wurde. Dieselbe Substanz erhielt er aus Extrakten der Lunge und Leber morphinisierter Hunde, wenn dieselben einige Zeit hindurch täglich größere Dosen Morphin subkutan erhalten hatten. Diese immer nur in geringer Menge aufgefundene Substanz stimmte in ihrer Reaktion mit dem von Tolstorff[13] genauer untersuchten Oxydimorphin überein, das sich aus Morphin in alkalischer Lösung unter dem Einfluß des atmosphärischen Sauerstoffes sehr leicht bildet. Donath[14] fand selbst nach Dosen von 0,75 g bis 1,5 g subkutan injizierten Morphins keine Spur von Morphin oder des von Marmè beschriebenen Derivates im Harn. Überdies zeigte er, daß Oxydimorphin gar nicht die Reaktion wie die von Marmè gefundene Substanz aufweist. Marquis[15] erhielt aus Leber und Nieren, aber nicht aus Harn einen ähnlich reagierenden Körper wie Marmè, der aber nicht Oxydimorphin war und den er als umgewandeltes Morphin bezeichnete. Bei der Umwandlung des Morphins im Organismus wurde ferner an die Paarung mit Schwefelsäure gedacht. Elliasow[16], Stollnikow und Baumann haben eine unverkennbare Vermehrung der gebundenen Schwefelsäure nach Morphin beim Hunde gesehen. Es handelte sich offenbar um Ätherschwefelsäure, deren Paarling als ein Umwandlungsprodukt des Morphins angesehen wurde. Auch das Auftreten von Glukuronsäure im Harn nach Morphinmedikation ist von Muskulus, Mering, Sundvik und P. Mayer[17] beobachtet worden. Nach Marquis[15] verschwindet Morphin aus dem Blute sehr rasch, indem es an gewisse Organe, wie

an das Gehirn verankert wird. Ein Teil wird mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure verestert, ein Teil oxydiert, während der Rest des Alkaloides unverändert als solches zur Ausscheidung gelangt. Ein nicht unwesentlicher Teil wird bei Menschen und Hunden durch die Drüsen des Magendarmkanals wieder ausgeschieden. Auch im Speichel ist Morphin meist leicht nachzuweisen. Einen interessanten Versuch beschrieb Langer[18], der den Versuchstieren Salzlösungen in den Magen brachte, was die Giftwirkung des Morphins und seiner Derivate außerordentlich herabsetzte, da unter dem Einfluß der Salze nach 1 Stunde bereits die doppelte Menge Morphin wie beim Kontrolltier im Magen ausgeschieden wurde. Auch Leinweber[19] bewies die Ausscheidung des Morphins in den Magen. Tauber[20] traf folgende Feststellung: „Das auf subkutanem Wege einverleibte Morphin wird in den Magen eliminiert und von hier aus in den Darm befördert. Ein Teil wird im Darm resorbiert, gelangt später wiederum in den Magen und wird schließlich mit den Fäzes ausgeschieden". Mit der von Tauber benützten Methode fand Faust[21] 10 Jahre später an Hunden, daß bei akuter Morphinvergiftung gegen 70% des verabreichten Giftes in den Fäzes wiedergefunden wird. Bei längerer Gewöhnung jedoch nimmt die Morphinmenge in den Fäzes stetig ab, um zuletzt ganz zu verschwinden. In den Organen des Tierkörpers, sowie im Harn konnte Morphin nicht aufgefunden werden. Faust schloß daraus, daß der tierische und menschliche Organismus im Verlaufe der Morphinvergiftung in steigendem Maße die Fähigkeit gewinnt, das Morphin rasch zu zersetzen. Die Ausführungen von Tauber und Faust über das Schicksal des Morphins haben eine umfangreiche Nachprüfung erfahren. Fausts Ansicht genügte nach Cloetta[22] und Rübsamen[23] nicht, um das Phänomen zu erklären, da sie Morphin in den Geweben von gewöhnten Tieren (Hunden und Ratten) in Mengen fanden, die bei ungewöhnten Tieren deutlich toxisch sind. Valenti[24] und andere stellten die Behauptung auf, daß der Organismus nach der Lehre Ehrlichs „Antitoxine" bilde, die eine Gewöhnung an das Morphin möglich machen. Jedoch widerlegten die Reihenversuche von Dumez[25], Pellini[26] und Greenfield[27] diese Auffassung.

Die meisten Nachuntersucher der Arbeiten von Tauber und Faust fanden die Hauptausscheidung des Morphins in der Niere, so Authenrieth[28] und v. Kaufmann-Asser[29], der mit seinem Verfahren das dem Harn zugesetzte Morphin bis zu 83% wieder finden konnte. Nach seiner Meinung ist die Ausscheidung nach 48 Stunden vollständig beendet. Am Kaninchen konnten innerhalb 24 Stunden 3—23% des Morphins wieder gefunden werden. Loofs[30] verbesserte das umständliche Ausschüttelungsverfahren und wies das Morphin im Harn von Personen nach, die längere Zeit Gaben von 150 mg bis herunter zu 15 mg erhalten hatten. Auch nach Takayanagi[31, 32] erfolgte die Ausscheidung fast restlos im Harn. Bei gewöhnten Tieren unterliegt das Morphin einer erhöhten Zerstörung. Fleischmann[33] fand bei subkutanen Gaben des Morphins über einige Stunden hin einen immerhin beträchtlichen Morphinspiegel im Blut, und nur eine minimale Speicherung im Gehirn (im Gegensatz zu Marquis[15] und Cloetta[22]). Große Mengen Morphin fanden im Harn Teruuchi und Kai[34] (18,4% in 16 Stunden bei Kaninchen und Hunden) sowie Fry, Light, E. G. Torrance und W. A. Wolff[35] (8,7—10,7%). Noch mehr als alle früher Genannten klärten die Versuche von Pierce und Plant[36] diesen Fragenkomplex. Von der täglichen Morphingabe werden nach ihren Ergebnissen durchschnittlich 12,5% durch Harn und Fäzes ausgeschieden. Das Verhältnis der in Harn und Fäzes ausgeschiedenen Morphinmengen verändert sich täglich, jedoch überwiegt stets die im Urin ausgeschiedene Morphinmenge. Ferner soll in der Ausscheidung bei gewöhnten und nicht gewöhnten Hunden nach gleicher Dosis je Kilogramm kein wesentlicher Unterschied bestehen. Dasselbe gab im wesentlichen Starkenstein[37] an. Nach seinen Versuchen an Tieren mit sehr hohen Dosen wird das Morphin zu 2—39% (10—15%)

ausgeschieden, wobei die angewandte Methode eine Bestimmung von weniger als 2 mg Morphin nicht mehr gestattet. Ellinger und Seeger[38] widersprechen nochmals der Ansicht Fausts[21], da es ihnen durch die bis zu ihrer Zeit weitestgehend verbesserten Nachweismethoden nicht gelang, bei gewöhnten und ungewöhnten Hunden Morphin nach subkutaner Zufuhr im Magensaft nachzuweisen. Panse[39] gelang es das umständliche Stas-Ottosche Verfahren abzukürzen: Er schüttelte den mit Natronlauge und Natriumbicarbonat alkalisch gemachten Harn lediglich mit Essigester aus.

Im Jahre 1936 entwickelte Deckert[40] ein Schnellverfahren zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen von Morphin im Harn, Blut und anderem biologischen Material durch nephelometrische Messung. Die Methode besteht darin, daß 10 cm^3 Harn nach Zusatz von Natriumbikarbonat mit Essigester einmal ausgeschüttelt werden. Der Essigester wird auf dem Wasserbade verdampft und die Trübung des Morphin-molybdat-vanadat-Komplexes durch Nephelometrie gemessen.

F. W. Oberst[41] ermittelte durch dreistündiges Kochen des Harnes mit $^1/_1$ Vol. konzentrierter Salzsäure, daß ein Teil des Morphins im gebundenen Zustand eliminiert wird. An Morphinisten wurde ohne Hydrolyse eine mittlere Tagesausscheidung von 6,37% (30 Proben) 4,39% (305 Proben) und 1,93% (17 Proben) der durchschnittlichen Tagesdosis festgestellt. Bei hydrolysierten Harnproben war der Morphingehalt etwas unregelmäßig, aber parallel zur Dosis. Gegenüber den nicht hydrolysierten Harnen war der Gehalt 3—36mal höher; in gleichen Harnproben überwog das gebundene Morphin das freie um das 2—35fache. Später teilte Oberst[42] mit, daß die Menge des gebundenen Morphins im Harn zunehmend mit steigender Dosis 3—10mal größer als jene des freien Alkaloides ist. Die mittlere Tagesausscheidung an freiem und gebundenem Morphin war 6 und 30%. Im Kot, Leber und Schweiß fand sich nur freies, in der Galle und Mageninhalt freies und gebundenes Morphin. Der in Galle und Mageninhalt vorhandene Paarling muß, da dessen Menge im Kot sehr klein ist, entweder bei der Darmpassage oder nach Resorption hydrolysiert werden. Das Vorhandensein eines Glukuronsäurepaarlings hält Oberst für wahrscheinlich, aber noch nicht für bewiesen.

III. Kritische Betrachtung über die Spezifität der Morphinbestimmung in Körperflüssigkeiten nach W. Deckert.

Durch die von Deckert[40] veröffentlichte Arbeitsmethode ist es möglich geworden, auf verhältnismäßig einfache Weise bei Verdacht auf eine Betäubungsmittelsucht Morphin im Harn schnell nachzuweisen. So konnten mehrere Dutzend Fälle mit positivem Erfolg, andere jedoch mit negativem Ausfall entschieden werden. Im Laufe der durchgeführten Kontrollen stellte sich heraus, daß in einzelnen Fällen, bei denen im Harn ein positiver Nachweis von Morphin erbracht war, kein Morphin eingenommen oder gespritzt worden war. (Mündliche Mitteilung von Herrn Dr. J. Deininger, Apothekendirektor am Krankenhaus links d. I., München.) Hass[43] beschrieb einen positiven Ausfall der Deckertschen Reaktion in Urinproben von Patienten, die Chinin, Pyramidon und Prontosil erhalten hatten. Ferner erhielt er bei der Aufarbeitung von konzentrierten Urinen in größerer Menge als Deckert angab, ebenfalls gelegentlich eine positive, dem Morphin ähnelnde Reaktion, obwohl die betreffenden Urinproben mit Sicherheit morphinfrei waren.

In seinen näheren Ausführungen gibt Deckert an:

a) Die Alkaloide: Chinin, Strychnin, Nikotin, Brucin stören die spezifische Morphinreaktion. Sie zeigen jedoch eine dem Morphin völlig fremde Reaktion, insofern, als die Trübung 1. so gut wie augenblicklich auftritt, 2. nach dem Verdünnen der Lösung zum größten Teil wieder verschwindet.

b) Dem Morphin analog reagieren: Dilaudid, Dicodid, Codein, Acedicon und Eukodal; vor allem stören Dilaudid und Dicodid. Die übrigen morphinverwandten Alkaloide reagieren mit so geringer Empfindlichkeit, daß ihr Nachweis und ihre Bestimmung mittels der Methode im Harn wohl kaum möglich erscheint.

IV. Eigene Versuche mit verbesserter Methode nach W. Deckert.

A. Methodik.

Die Untersuchung der Harne geschah nach den Angaben Deckerts[40] in folgender Weise: 10 cm³ Harn wurden mit 0,3 g $NaHCO_3$ versetzt und unter Umschütteln bis zum Aufsteigen der ersten Siedeblasen erwärmt. Nach Abkühlung wurde der Harn in einen Schütteltrichter umgefüllt und mit 20 cm³ Essigester $^1/_2$ Min. kräftig geschüttelt. Nach Trennung der Schichten wurde der Essigester in eine kleine Porzellanschale filtriert und diese auf dem Wasserbade erhitzt. Der Rückstand wurde in 0,25 cm³ H_2O + 1 Tropfen HNO_3 (spezifisches Gewicht 1,15) + 1 Tropfen Molybdatlösung (10% Ammoniummolybdat in H_2O) gelöst und filtriert. Schälchen und Filter wurden zweimal mit 0,2 cm³ H_2O nachgespült. Zur Fällung des Salzes als Vanadin-Molybdänkomplex wurde das Filtrat mit 2 Tropfen Ammonium-Vanadat (2% Ammonium-Vanadat in H_2O) versetzt. Nach 20 Min. wurde mit H_2O auf 5 cm³ verdünnt.

Bei Gegenwart von Morphin erreichte die Trübung nach 20 Min. ihr Maximum und löste sich nach der Verdünnung nicht.

Zur Filtration des Essigesterrückstandes verwendete Deckert einen Trichter mit Wattebausch. Zur Beseitigung der mit Ammonium-Molybdat erzeugten Trübung erwies sich jedoch ein Mikroglasfilter nach Pregl (G 3) als besser geeignet.

Da die vorgeschriebene Menge von 0,3 g $NaHCO_3$ nicht immer genügte, um einen saueren Harn zu alkalisieren, wurde stets 0,5 g $NaHCO_3$ verwendet.

Ferner wurde im Parallelversuch unter Verwendung der doppelten Menge Harn (20 cm³) und der doppelten Menge an Chemikalien in der letzten Phase die eine Hälfte (nach Deckert) mit Ammonium-Vanadat, die andere Hälfte mit Silikowolframsäure (2% Silikowolframsäure in H_2O) als Komplex gefällt. Letztere Fällung trat bei Gegenwart von Morphin stets augenblicklich und intensiver auf.

B. Ergebnisse der Versuche.

Zu III a. Bei verschiedenen Patienten, die eine abendliche Dosis von 0,4—0,5 g Chinin erhalten hatten, zeigte die Untersuchung des gesammelten 12-Stundenharnes eine allmähliche Trübung nach der Deckertschen Reaktion, die auch nach der Verdünnung nicht verschwand. Diese Reaktionen unterschieden sich also größtenteils nicht von der des Morphins. Auch in der Fällung mit Silikowolframsäure konnte eine augenblickliche Trübung beobachtet werden.

Zu III b. Eine einmalige Medikation von 0,012 g Dilaudid zeigte im gesammelten 12-Stundenharn nach Deckert eine dem Morphin

Tabelle 1. *Positive Reaktionen nach* DECKERT *und nach Fällung mit Silikowolframsäure bei Verabreichung von Alkaloiden außer Morphin.* Vorgenommene Untersuchungen am gesammelten 12-Stundenharn von folgenden Patienten.

Name des Patienten	Datum	Diagnose	Medikation[1] per os	Dosis
R. K.	11. 10. 46	Ischiasneuralgie	Chinin	2mal 0,2
D. K.	12. 10. 46	Arthrosis deformans	Chinin	2mal 0,2
F. Z.	13. 10. 46	Rektumkarzinom	Chinin	2mal 0,2
E. B.	14. 10. 46	Pankreaskopfkarzinom	Dilaudid i.m.	0,012
A. E.	16. 10. 46	Ischiasneuralgie	Dilaudid i.m.	0,012
B. L.	17. 10. 46	Oberschenkelfraktur	Dilaudid i.m.	0,012
F. S.	11. 11. 46	Pneumonie	Dicodid	2mal 0,01
H. L.	17. 10. 46	Ischiasneuralgie	Codein	0,05
E. H.	18. 10. 46	Grippeinfekt	Codein	0,05
H. S.	20. 2. 47	Rektumkarzinom	Acedicon	1mal 0,005
E. D.	20. 2. 47	Arthrosis deformans	Acedicon	2mal 0,005
J. B.	21. 2. 47	QUINCKEsches Ödem	Acedicon	1mal 0,005
S. V.	20. 2. 47	Ischiasneuralgie	Eukodal	0,005
R. L.	21. 2. 47	Pneumonie	Eukodal	2mal 0,005
G. H.	21. 2. 47	Mammakarzinom	Eukodal	2mal 0,005
H. B.	30. 9. 47	Rektumkarzinom	Dolantin[2]	2mal 0,025
G. P.	1. 10. 46	Ileus	Dolantin[3]	0,05
A. G.	31. 7. 46	Pankreaskarzinom	Dolantin[4]	0,05
L. H.	3. 10. 46	Mammakarzinom	Dolantin	0,05
L. H.	4. 10. 46	Mammakarzinom	Dolantin	0,05
L. H.	5. 10. 46	Mammakarzinom	Dolantin	0,05
H. D.	25. 10. 46	Ischiasneuralgie	Paracodin	0,02
H. D.	26. 10. 46	Ischiasneuralgie	Paracodin	0,02
H. D.	27. 10. 46	Ischiasneuralgie	Paracodin	0,02
A. E.	26. 10. 46	Ischiasneuralgie	Paracodin	0,02
J. S.	27. 10. 46	Grippeinfekt	Paracodin	0,02

[1] Die Medikamente wurden größtenteils abendlich gegeben. — [2] Die Medikation bestand schon 12 Tage. — [3] Die Medikation bestand schon 8 Tage. — [4] Die Medikation bestand schon 10 Tage.

vollkommen ähnliche Reaktion, in gleicher Weise verhielten sich 0,05 g Codein und 0,01 g Eukodal, obwohl deren Empfindlichkeit von DECKERT für zu gering erachtet wurde, um die Morphinreaktion zu stören. Auch trat eine Trübung mit Silikowolframsäure in allen Fällen ein.

Als neue, in der Literatur bis jetzt noch nicht angegebene, die DECKERTsche Reaktion störende Stoffe konnten Dolantin und Paracodin festgestellt werden. Hier hat sich gezeigt, daß bei Einnahme der Normaldosis die DECKERTsche Reaktion, sowie die Fällung mit Silikowolframsäure sich in keiner Weise von der mit Morphin unterscheidet. Auch hier trat die Reaktion nach DECKERT allmählich auf, erreichte nach 20 Min. ihren Höhepunkt; bei Silikowolframsäure trat die Trübung sofort ein. Nach Verdünnung erfolgte keine Lösung des Niederschlags.

2. Teil.

Biologische Nachweismethoden.

I. Einleitung.

Bei den biologischen Proben ist im Vergleich zu den chemischen eine Reindarstellung der Substanz in der Regel nicht erforderlich. Ferner genügen viel geringere Mengen als zum chemischen Nachweis.

II. Augenblicklicher Stand der Frage des biologischen Morphinnachweises.

Im Jahre 1911 machte Straub[44] folgende Beobachtung: Wenn man der weißen Maus unter die Rückenhaut eine kleine Quantität Morphin injiziert, so gerät ihr Schwanz in eine katatonische Starre, die sich darin äußert, daß er sich in ~-förmiger Dorsalflexion nahezu parallel zur Wirbelsäule legt. Auf diese Beobachtung gründete O. Herrmann[45] eine Methode zum Nachweis von Morphin in Blut, Harn und Geweben. Der Harn wurde dabei zur Trockene eingedampft, dann mit 3—4facher Menge weinsaurem absolutem Alkohol 1 Stunde extrahiert. Nach Verdampfen des Alkohols wurde der Rückstand mit der gleichen Menge Wasser, wie ursprünglich Harn vorhanden war, aufgenommen, die Lösung filtriert, neutralisiert und in der Menge von 0,5—1 cm^3 subkutan injiziert. Doch erkannte Herrmann bereits Nikotin, Codein und Heroin als störend für die Schwanzreaktion.

Pulewka[46] stellte die Behauptung auf, daß dieses Schwanzphänomen Zeichen einer starken Erregung des Atemzentrums, also ein Symptom absoluter und relativer Asphyxie sei. So erklärten sich die Wirkungen des Thebains, Koffeins, Theobromins, Kokains, Kampfers, der Blausäure (Rassers[47]), die ebenfalls das Schwanzphänomen auslösen, wie auch Nikotin (Jensen und Rumry[48]), Picrotoxin, sowie Einatmung hoher CO_2-Konzentrationen (Rassers[47]). Zu diesen Störungsstoffen kamen nach Untersuchungen von Okuda und Sôzaburô[49] noch Dionin, Eukodal, Dicodid, Peronin, Narkotin und Papavarin hinzu. Die Autoren behaupten, daß die Stärke der Schwanzreaktion von der Stärke der Wirkung auf das Zentralnervensystem abhängig ist. Keil und Kluge[50] stellten fest, daß Scopolamin die Mäuseschwanzreaktion stark hemmt und benutzten dieses Ergebnis zu quantitativer Auswertung. Neuerdings reiht sich nun noch das Dolantin ein, das ähnlich wie Morphin das Mäuseschwanzphänomen auslöst. Dies konnte auch in eigenen Versuchen bestätigt werden (s. unten). Macht[51] führte die Straubsche Morphinreaktion der Mäuse auf die Piperidinkomponente des Morphins zurück, da Piperidin ähnlich wirkte. In der quantitativen Auswertung kamen Keil und Kluge[50] zu Ergebnissen, die das Morphin bis zu 12γ mit einer Genauigkeit von 5% nachweisen ließen. Später hielt Juul[52] nach ausgedehnten Versuchen 0,2—0,5 mg Morphin je Maus (bei 10 Mäusen) endgültig für die unterste Grenze der noch mit Sicherheit durch die Schwanzreaktion nachweisbaren Menge.

Ein biologisches Nachweisverfahren von Tremonti[53] gründet sich auf die Behauptung, daß das Morphin beim Durchströmen der Hinterbeinarterie des Frosches noch in der Verdünnung 1 : 2 Millionen ausgesprochene Gefäßkontraktion bewirke. Doch kommt dieser Methode keine forensische Bedeutung zu. Ein weiteres, doch sehr kompliziertes Verfahren zum biologischen Nachweis des Morphins ist von Fichtenberg, Denisé und Lévy[54] beschrieben worden. Der Nachweis stützt sich auf die Beobachtung von Kahane und Lévy[55], die feststellten, daß das Morphin die Wirkung der durch Esterase beeinflußten Gifte

insonderheit von Cholinderivaten auf den Blutegelmuskel fördert, die Wirkung von esteraseunabhängigen Cholinderivaten aber hemmt. Da diese Morphinwirkungen durch Auswaschen leicht reversibel sind, können sie zur biologischen Wertbestimmung kleiner Morphinmengen verwertet werden, indem die Dosen aufgesucht werden, die die Wirkung der Choline um 20—40% herabsetzen. Wegen der oft ungleichmäßigen Reaktion des Blutegelmuskels sind Kontrollversuche erforderlich, wodurch die Methode umständlich wird.

Auf Grund der aus der Literatur und eigenen Versuchen eindeutig hervorgehenden ungenügenden Spezifität des chemischen und biologischen Nachweises ergab sich die Notwendigkeit, nach einer zuverlässigen spezifischen Nachweismethode zu suchen. Die Ausführung mußte möglichst einfach sein, damit deren nutzbringende Anwendung nicht nur einem kleinen Kreise von Fachleuten vorbehalten bliebe.

Die mydriatische Wirkung des Morphins an der Mäusepupille wurde im folgenden einem biologischen Nachweis zugrunde gelegt.

III. Die Morphinwirkung auf das Auge.

Während bei Menschen und Hunden eine typische Morphinmiosis in Erscheinung tritt (Henderson und Graham[56]), führen beim Kaninchen kleine Morphindosen zu Miosis, große Dosen zu Mydriasis (Kinukowa[57]). Beim Pferd, bei der Katze (Mintscheff[58]) sowie bei der Maus (Pulewka[59]) hingegen kommt es stets zur Mydriasis.

IV. Die Morphinmydriasis bei der weißen Maus.

Girndt und Evers[60] zeigten, daß sich die Morphinmydriasis regelmäßig und in gleicher Stärke wie an normalen, auch an großhirnlosen Katzen auslösen läßt. Früher wurde die Morphinmydriasis der Katze als Teilerscheinung der psychomotorischen Erregung aufgefaßt, die das Wirkungsbild größerer Morphingaben bei Katzen darstellt. Dies wird von Girndt[61] bestritten, da er nachweisen konnte, daß Morphin seine mydriatische Wirkung bei Katzen bereits in sedativ wirkenden Gaben zeigt.

Die Pupillenerweiterung ist der Ausdruck einer Lähmung des parasympathischen Okulomotoriuszentrums. Der Mechanismus der Mydriasis bei Katze und Maus, wie der Miosis beim Menschen nach Morphin ist im wesentlichen noch unbekannt.

V. Sonstige bei der weißen Maus mydriatisch wirkende Stoffe und ihr Schicksal im tierischen und menschlichen Organismus.

Vorversuche erbrachten die Erkenntnis, daß die Pupille der Maus gesetzmäßig auf Morphin mit einer Mydriasis reagiert. Es stand jedoch die Schwierigkeit im Wege, daß andere mydriatisch wirkende Pharmaka diesen Morphinnachweis stören könnten. Aus diesem Grunde wurden zunächst andere mydriatisch wirkende Stoffe unter Berücksichtigung ihres Schicksals im Organismus, insonderheit ihrer Ausscheidung im Harn, untersucht.

A. Atropin.

Zum ersten Male beschrieb Kratter[62] das Vorkommen von Atropin im Harn nach Atropinmedikation. Auf Grund von Kaninchenversuchen fand Dragendorff[63] eine schnelle Ausscheidung des Alkaloids. Wiechowski[64] fand innerhalb 48 Stunden Atropin unverändert zu 17—57,6% der gegebenen Dosis im Harn.

Die Belladonnaalkaloide werden schnell aus dem Magendarmtrakt resorbiert. Atropin verschwindet schnell aus dem Blute und wird im ganzen Körper verteilt. In der Leber werden sie zum größten Teil durch Esterhydrolyse gespalten. Innerhalb 14 Stunden wird Atropin ungefähr zu $^1/_3$ durch die Niere ausgeschieden (Goodmann, Gilmann[65]).

B. Scopolamin.

Über die Ausscheidung des Scopolamins ist wenig bekannt. Kobert, Sohrt[66] und Windscheid[67] fanden es nach subkutanen und intravenösen Gaben bei Hunden im Harn wieder. Beim Kaninchen erscheint ein Teil des injizierten Alkaloids im Harn, doch ist es unbekannt, in welchem Verhältnis es ausgeschieden wird (Cushny[68]).

C. Dolantin.

Auch Dolantin lähmt den Parasympathikus, jedoch tausend bis zehntausendfach schwächer als Atropin. Dies soll sich auch in seiner Pupillenwirkung zeigen.

Über die Abbau- und Ausscheidungsverhältnisse im menschlichen Körper sind noch keine sicheren Unterlagen bekannt. Soviel scheint jedoch nach der Literatur festzustehen, daß nur ganz unbedeutende Mengen unverändert zur Ausscheidung kommen. Im Tierversuch konnte Dolantin auch nach sehr hohen Gaben nicht im Harn nachgewiesen werden. Beim Menschen werden offenbar bis zu 1% der dargereichten Menge im Harn ausgeschieden. Da es sich bei Dolantin um einen 1-Methyl-4-phenylpiperidin-4-carbonsäureäthylester handelt, dürfte der erste Schritt des Abbaues eine Verseifung zur analgetisch unwirksamen Säure sein. Der Nachweis der freien Säure ist jedoch bisher noch nicht einwandfrei gelungen (gemäß Mitteilung von Herrmann, Farbwerke Höchst, U.S. Administration 25. September 1946).

D. Die Adrenalin-Ephedrinreihe.

Zur sympathikomimetischen Wirkung dieser Gruppe gehört auch eine mydriatische; sie wird durch die Substitution des paraständigen Wasserstoffatoms durch Hydroxyl nur wenig geändert, dagegen durch die Substitution mit der Methoxy-, Nitro- oder Aminogruppe (Thiel[69]). Immerhin zeigte sich, daß die Basen mit 2 Hydroxylgruppen im Kern eine schwächere mydriatische Wirkung als die unsubstituierten Phenylalkylamine entfalten.

Seit Guggenheim, Löffler[70] und Loewe[71] geht die allgemeine Ansicht dahin, die rasche Zerstörbarkeit des Adrenalins und seiner näheren Verwandten und damit die Flüchtigkeit ihrer Wirkung den leicht angreifbaren phenolischen Hydroxylgruppen zur Last zu legen. Die Wirkungsdauer muß dann zunehmen mit der Abnahme der Zahl der Hydroxylgruppen. Die Oxydation bzw. Dehydrierung des Adrenalins verläuft bekanntlich über die chinoide Form, das Adrenochrom, zum Adrenoxin (Ball und Clark[72]). Als inaktives Oxydationsprodukt des Adrenalins wurde von Weinstein und Manning[73] die Protokatechusäure angesehen, die im Harn von adrenalininjizierten Kaninchen erscheint.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, daß Adrenalin zu 80% als Ätherschwefelsäure im Harn ausgeschieden wird (Mitteilung der Firma Ch. Boehringer-Sohn, Ingelheim 25. 7. 47). Auf die Befunde von Seitz[74] über die Hemmung

der Dehydrierung des Adrenalins durch Askorbinsäure und die Möglichkeit eines Bernsteinsäureabbaues nach MARQUARD[75] sei verwiesen. BRESSLER[76] fand, daß hohe orale Gaben von Sympathol (400—600 mg) ein sofortiges Ansteigen der Oxyphenylderivate im Urin bewirken.

BLASCHKO, HERMANN, RICHTER und SCHLOSSMANN[77, 78, 79] konnten zeigen, daß die aromatischen und aliphatischen Amine im tierischen Organismus einem enzymatischen Abbau unterworfen werden. Sie nehmen an, die Adrenalinoxydase, die Tyraminase und die sog. Aminooxydase sind miteinander identisch und folgern, daß z. B. für Oxydation und Abbau des Adrenalins weder die alkoholische Hydroxylgruppe noch die phenolische Hydroxylgruppe, noch auch die N-Methylgruppe wesentlich sind. LUMIÈRE und MEYER[80] konnten bei vergleichender Applikation dreier isomerer Amine bei subkutaner und intrakardialer Zufuhr eine rasche intravitale Entgiftung des α-γ-Phenyl-propylamins feststellen, während die β-Verbindung anhaltend wirksam war und nur langsam entgiftet wurde. BLASCHKO[78] berichtete über die hemmende Wirkung des Ephedrins und verwandter Körper auf diese Fermentsysteme. Phenylisopropylamin und seine Derivate (Ephedrin) werden von Aminooxydase nicht oxydiert.

Bei Hunden mit Leberschädigung, die durch Tetrachlorkohlenstoff hervorgerufen wurde, wird die doppelte Menge der sonst erscheinenden Menge des Phenylisopropylamins im Harn ausgeschieden (BEYER und SKINNER[81]).

Abschließend kann über die Ausscheidung der Körper der Adrenalin-Ephedrinreihe gesagt werden, daß Adrenalin zur Protokatechusäure oder Ätherschwefelsäure abgebaut und ausgeschieden wird. Die Widerstandsfähigkeit von Ephedrin erklärt seine lange Wirkungsdauer. Praktisch ist nichts näheres über die Ausscheidung dieses Medikaments aus dem Körper bekannt, außer, daß es nicht schnell durch die Nieren entfernt wird. Die Benzedrine bleiben im Körper stabil. Sie sind stabiler als Ephedrin und werden langsam durch die Nieren ausgeschieden. Beim Menschen beginnt die Ausscheidung 3 Stunden nach oraler Anwendung; etwa 43% erscheinen innerhalb 48 Stunden im Harn (BEYER und SKINNER[81]).

E. Kokain.

Zu den resorptiven Erscheinungen nach Kokain gehört die Pupillenerweiterung auf Grund seiner sympathikomimetischen Eigenschaft.

Es wird bei oralen Gaben teils im Magendarmtrakt hydrolysiert, teils in der Leber fixiert und ziemlich rasch zerstört.

Nach WIECHOWSKI[64] wird Kokain vom Hunde zu 5% durch die Nieren ausgeschieden, dagegen beim Kaninchen überhaupt nicht. Nach ihm ist anzunehmen, daß es vom Kaninchen und vom Hund tiefgreifend und größtenteils zersetzt wird. Das Zersetzungsprodukt Ekgonin konnte er im Harn nicht nachweisen, während RIFATWACHDANI[82] im Kaninchenharn nicht nur Kokain fand, sondern auch Ekgonin. Über die Ausscheidung dieses Alkaloides sind keine Zahlen bekannt, doch ist anzunehmen, daß es, wenn überhaupt, nur in ganz minimalen Mengen vorhanden ist.

VI. Eigene Versuche über die mydriatische Wirkung verschiedener Pharmaka an weißen Mäusen.

A. Methodik.

Zur Verwendung kamen weiße Mäuse im Gewicht von 15—22 g. Sie wurden mit Milch, Wasser, Weißbrot, Hafer und Haferflocken ernährt. Es wurde dafür gesorgt, daß die Tiere in keiner Weise unruhig wurden, da jede Erregung die

Pupillenweite beeinflußt. Die Versuche kamen in einem völlig ruhigen Raum zur Ausführung. Während der Versuche befanden sich die Tiere in dunklen Einzelkäfigen. Es kamen nur männliche Tiere zur Verwendung, weibliche Tiere sowie vorübergehend erregte Mäuse wurden während der Versuche ferngehalten. Die gebrauchten Mäuse kamen erst nach 10 Ruhetagen wieder in den Versuch.

Die Messungen der Pupillenweite wurden im abgedunkelten Zimmer vorgenommen, mit Hilfe eines 24mal vergrößernden Präpariermikroskops und darin eingebauten Okularmikrometers mit $^1/_{10}$ mm Skaleneinteilung. Die Pupille wurde mit einer 40-Watt-Lampe von oben, im Abstand von 10 cm beleuchtet. Die Mäuse wurden in folgender Weise gehalten: mit Daumen und Zeigefinder faßt die linke Hand die Haut im Nacken des Tieres, der fünfte Finger klemmt den Schwanz gegen den kleinen Fingerballen. Die rechte Hand faßt den Kopf des Tieres und öffnet mit Daumen und Zeigefinger das Auge (Daumen am Unterlid, Zeigefinger am Oberlid). Das rechte Auge der Maus kann so gut beobachtet werden. Man muß darauf achten, daß die Mäus nicht zu fest gehalten wird, um die Atmung nicht zu behindern, da dadurch schnell eine Mydriasis auftritt.

Nach kurzer Übung gelingt es das Tier schonend zu halten. Die Ablesung geschieht erst dann, wenn sich die Pupille adaptiert hat.

Der normale Pupillendurchmesser ist bei normal genährten Mäusen durchschnittlich um 0,3 mm. Mäuse mit Pupillen über 0,4 mm wurden weggelassen, da es sich zeigte, daß die größeren Pupillen der Durchschnittspupille nicht proportional reagierten. Auch zeigten Pupillen unter 0,2 mm andere Werte, sie reagierten träger. Sämtliche Messungen wurden in der Zeit von 10—17 Uhr vorgenommen. Die Applikation der Stoffe geschah durch subkutane Injektion (0,1—1,0 cm³).

Es kamen je Versuch stets, falls nicht anders angegeben, 3 Mäuse zur Verwendung, wobei der Mittelwert errechnet wurde. Nach Messung der Anfangspupille wurde nach Anwendung des Mittels alle 15 Min. abgelesen, bis die Pupille ihr Maximum erreicht hatte.

B. Beschreibung der Versuche und ihre Ergebnisse.

I. Teil: Die Wirkung der Reinsubstanzen in wäßriger Lösung an der Mäusepupille.

a) Die mydriatischen Stoffe.

1. Den zeitlichen Verlauf der Morphinwirkung an der Pupille nach subkutaner Injektion von 10—200 γ Morphin-HCl je 20 g Maus (an 10 Versuchstieren) zeigt Abb. 1.

Tabelle 2.

	Dosis in mg je 20 g Maus	Quotient
1	0,01	2
2	0,05	2,3
3	0,1	3
4	0,2	4

Fast in allen Versuchen bestätigte es sich, daß das Maximum der Morphinwirkung in 45 Min. erreicht war. Die anfänglichen Pupillenwerte lagen fast gesetzmäßig auf einer Geraden vom Anfangs- zum Maximalwert.

2. Auf Abb. 2 ist die an einem Material von 40 Mäusen ermittelte Dosenwirkungskurve dargestellt.

Die Werte von 10—200 γ je 20 g Maus lagen auch hier fast gesetzmäßig auf einer Geraden.

Die Quotienten aus dem größten, nach Anwendung des Mittels beobachteten Wert und dem Normalwert der Pupillenweite bei einer Anfangspupille von 0,3 mm gibt Tabelle 2.

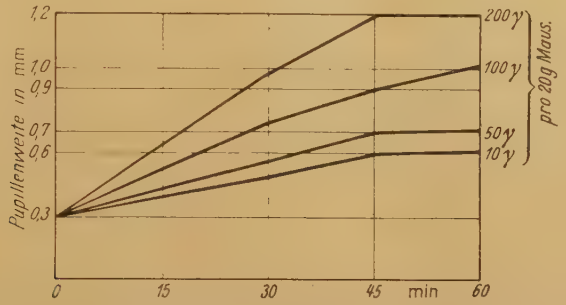


Abb. 1. Wirkung von Morphin-HCl auf die Mäusepupille. Zeitliche Entfaltung der Wirkung.

In gleicher Weise wurden die dem Morphin analog wirkenden Stoffe, wie Dilaudid 3 γ/g, Dicodid 5 γ/g, Eukodal 10 γ/g, Dionin 30 γ/g, Acedicon 2,5 γ/g, Codein 30 γ/g, Paracodin 10 γ/g und Apomorphin

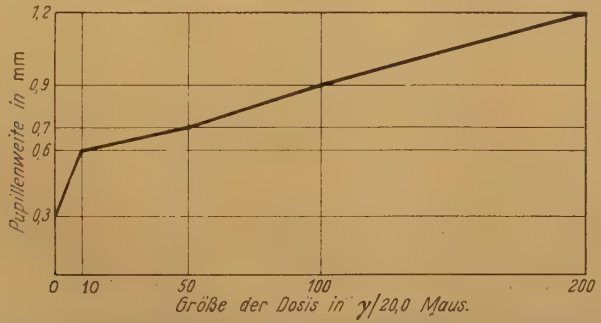


Abb. 2. Wirkung von Morphin-HCl auf die Mäusepupille. Dosenwirkungskurve.

10 γ/g geprüft. Die Wahl der Dosis entsprach dem Verhältnis zur Toxizität von 0,01 mg Morphin je 1 g Maus.

Tabelle 3.

	Stoff	Lösung	Tiergewicht in g	Pupillenweite nach Minuten			
				—	15	30	45
1	Eukodal	0,02:60	19	0,3	1,3	1,9	1,9
2	Dilaudid	0,02:200	20	0,3	1,0	1,1	1,2
3	Dicodid	0,02:120	20	0,3	0,7	0,8	0,8
4	Acedicon	0,02:240	15	0,3	0,5	0,6	0,6
5	Dionin	0,02:20	20	0,3	0,4	0,5	0,6
6	Codein	0,02:20	19	0,3	0,4	0,6	0,6
7	Paracodin	0,02:60	22	0,3	0,4	0,5	0,7

Apomorphin zeigte keine Pupillenreaktion.

Weiterhin wurden die Mydriatika (Parasympathikolytika und Sympathikomimetika) geprüft. Das Volumen der unter die Rückenhaut gespritzten Flüssigkeit lag zwischen 0,1—0,5 cm³.

Die Dosis der in Abb. 3 aufgezeigten Substanzen war für Atropin 0,2 γ/g, Skopolamin 0,5 γ/g, Dolantin 0,1 mg/g, Bridal 0,05 mg/g, Sympatol 1 mg/g, Ephedrin 0,3 mg/g und Kokain 50 γ/g Maus. Nikotin 0,01 γ/g und 25 γ/g, Antistin 0,1 mg/g und Adrenalin 1 γ/g Maus zeigten keine Pupillenreaktion.

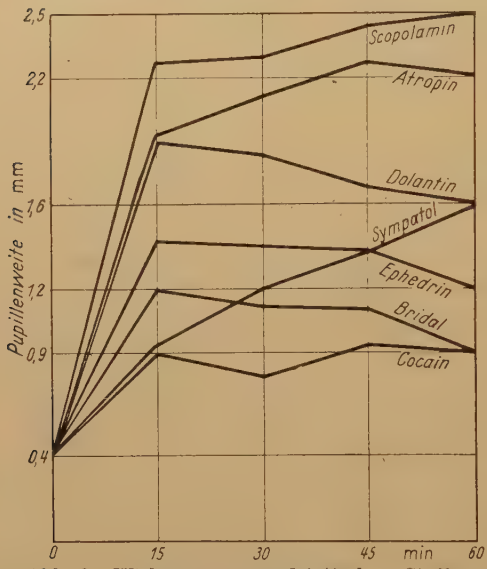


Abb. 3. Wirkung von mydriatischen Stoffen auf die Mäusepupille.

b) Ausschaltung der die Morphinreaktion störenden Stoffe.

Alle diese Stoffe galt es nun in ihrer mydriatischen Wirkung von Morphin durch Zerstörung zu trennen, wobei nach Möglichkeit die oben (Tabelle 3) unter 1—4 genannten Morphinderivate beständig bleiben sollten, was mit Ausnahme des Acedicons auch der Fall war.

Es wurde versucht, die Stoffe durch Kochen und Verseifung weitestgehend zu zerstören und ihrer mydriatischen Wirkung zu berauben. Gesättigtes Barytwasser erwies sich dabei als das Mittel der Wahl. So zeigte sich, daß Atropin, Scopolamin, Kokain, Bridal, Acedicon und Paracodin bereits nach 5 Min. langem Kochen mit Barytwasser (auf 10 cm³ Lösung 1 cm³ gesättigtes Barytwasser) zerstört waren. Das Barium konnte vor der Injektion der Lösung mit H_2SO_4 ausgefällt werden.

Dolantin, Eukodal, Dilaudid, Dicodid, Dionin, Codein, Sympatol und Ephedrin, sowie Morphin blieben nach dieser Behandlung in ihrer mydriatischen Wirkung unverändert.

Da es das Ziel dieser Arbeit ist, einen *spezifischen* Morphinnachweis zu finden, wurde nun nach einer Möglichkeit gesucht, das Dolantin in seiner mydriatischen Wirkung vom Morphin zu trennen. Als 1-Methyl-4-phenylpiperidin-4-carbonsäureäthylester könnte Dolantin im Organismus durch Verseifung zur Methylphenylpiperidincarbonsäure abgebaut werden. Es erscheint jedoch nicht als solche im Harn,

denn es war nicht möglich, durch Ausschütteln des Harnes mit organischen Lösungsmitteln in saurer Lösung diese Säure zu eliminieren. Dagegen war es möglich, nach 5 Min. Kochen einer wäßrigen Dolantinlösung (1:200) mit Barytwasser und N/1 Natronlauge das Dolantin bzw. etwaige Abbauprodukte mit organischen Lösungsmitteln (siehe spätere Versuche) auszuschütteln. Da wohl nicht anzunehmen ist, daß sich im Urin bei Einnahme von Dolantin die Methylphenylpiperidincarbonsäure vorfindet, wurden Ausschüttelungsversuche am reinen Dolantin vorgenommen. Bereits nach einmaligem Ausschütteln der wäßrigen Dolantinlösung (1:200) mit gleicher Menge Äther war soviel Dolantin in den Äther übergegangen, daß die wäßrige Lösung an der Maus keinen mydriatischen Effekt mehr auslöste. Nach 4 Ausschüttelungen war das Dolantin bis zu 100% in den Äther gelangt. Dasselbe Ergebnis zeigte sich nach Ausschüttelung mit Chloroform. Das Morphin dagegen blieb bei dieser Behandlung in der wäßrigen Lösung und ließ sich erst nach Zusatz von $NaHCO_3$ ausschütteln.

Nach diesen Ergebnissen verblieben nur noch folgende, die Morphinmydriasis störenden Stoffe, im Kreise der Betrachtung: Sympatol, Ephedrin und Codein. Jedoch verloren auch diese Stoffe an Bedeutung, als im folgenden Teil der Arbeit festgestellt wurde, daß sie beim Vorhandensein im Harn durch die angestrebte Methode nicht faßbar waren und somit feststand, daß sie eine mydriatische Wirkung in meßbarem Umfange nicht entfalten konnten.

II. Teil: Die Wirkung der im Harn erscheinenden mydriatischen Stoffe.

a) Ausschaltung der im Harn erscheinenden, die Mäusepupillenreaktion störenden Stoffe.

Die mydriatischen Stoffe: Atropin, Scopolamin, Dolantin, Sympatol, Ephedrin, Pervitin und Codein wurden auf ihr Erscheinen im menschlichen Harn geprüft.

Dabei kamen folgende Methoden für die Aufarbeitung der Harne zur Ausführung:

Methode I. 1 cm³ Harn wurde, falls er trüb war und sauer reagierte, filtriert und daraufhin mit N/10 NaOH neutralisiert, wobei 1 cm³ Harn je 20 g Maus unter die Rückenhaut zur Injektion kam.

Methode II. 30 cm³ Harn wurden mit 1,5 g $NaHCO_3$ bis zum Aufsteigen der ersten Siedeblasen erwärmt und nach dem Erkalten mit 60 cm³ Essigester dreimal kräftig ausgeschüttelt. Der Essigester wurde in eine Porzellanschale filtriert und auf dem Wasserbade verdampft. Der Rückstand wurde mit 5 Tropfen N/10 HCl gelöst und filtriert, Schale und Filter einmal mit 1 cm³ H_2O, das zweitemal mit 0,5 cm³ H_2O nachgespült. Die Lösung wurde mit N/10 NaOH neutralisiert und davon 0,6 cm³ je 20 g Maus injiziert.

Methode III. 30 cm³ Harn wurden mit Barytwasser stark alkalisch gemacht und 5 Min. gekocht. Durch Zugabe von N/1 H_2SO_4 wurde der Harn wieder bis

Tabelle 4.

Name[1]	Datum	Medikation per os	Dosis	Methode
H. E.	12. 9. 47	Sympatol	3 × 0,1	I und II keine Pupillenreaktion
F. Z.	11. 9. 47	Sympatol	3 × 0,1	
R. L.	17. 9. 47	Sympatol	3 × 0,1	
M. A.	17. 9. 47	Ephedrin	3 × 0,05	
H. N.	17. 9. 47	Ephedrin	2 × 0,05	
H. T.	17. 9. 47	Ephedrin	1 × 0,05	
M. L.	18. 9. 47	Pervitin	1 × 6,0 mg	
O. P.	18. 9. 47	Pervitin	3 × 3,0 mg	
R. D.	10. 9. 47	Pervitin	1 × 0,01	
L. S.	10. 9. 47	Codein	1 × 0,2	
F. Z.	19. 9. 47	Codein	1 × 0,2	
R. D.	19. 9. 47	Codein	2 × 0,2	

[1] Es handelte sich um Patienten mit Neuralgien und Frakturen als Diagnose.

Tabelle 5.

Name[1]	Datum	Medikation	Dosis mg	Methode	Mäusepupillenreaktion: Gewicht g	Anfangspupille mm	nach Minuten 15	30	45
R. S.	11. 9. 47	Atropin per os	3× 0,5	I	20	0,3	0,7	0,9	0,8
		intravenös	1× 0,5	II	19	0,3	0,4	0,6	0,7
				III	keine Pupillenreaktion				
H. S.	17. 9. 47	Atropin per os	3× 0,6	II	20	0,3	0,5	0,9	0,9
				III	keine Pupillenreaktion				
M. Z.	17. 9. 47	Atropin per os	3× 0,6	I	19	0,3	0,6	0,7	0,6
				II	21	0,4	0,7	0,8	1,2
				III	keine Pupillenreaktion				
R. K.	17. 9. 47	Atropin per os	3× 0,5	I	19	0,3	0,4	0,5	0,4
				II	20	0,4	0,7	0,9	1,1
				III	keine Pupillenreaktion				
H. D.	2. 10. 47	Scopolamin subkutan	1× 0,3	I	21	0,3	0,4	0,4	0,3
				II	22	0,3	0,4	0,5	0,6
				III	keine Pupillenreaktion				
R. L.	2. 10. 47	Scopolamin subkutan	1× 0,3	I	20	0,3	0,5	0,6	0,6
				II	23	0,3	0,4	0,4	0,4
				III	keine Pupillenreaktion				
W. Z.	2. 10. 47	Scopolamin subkutan	1× 0,3	I	23	0,3	0,3	0,5	0,6
				II	20	0,3	0,5	0,6	0,6
				III	keine Pupillenreaktion				
G. H.	25. 9. 47	Dolantin subkutan	1× 100	I	20	0,3	0,6	0,8	0,7
				II	keine Pupillenreaktion				
F. T.	25. 9. 47	Dolantin subkutan	1× 100	I	20	0,4	0,5	0,9	0,7
				II	keine Pupillenreaktion				
O. L.	20. 9. 47	Dolantin subkutan	2× 100	II	20	0,3	0,4	0,5	0,5
				III	keine Pupillenreaktion				
L. H.	30. 9. 47	Dolantin subkutan	3× 100	II	18	0,2	0,5	0,6	0,6
				III	20	0,3	0,4	0,5	0,5
G. B.	22. 9. 47	Dolantin subkutan[2]	3× 100	II	19	0,3	0,5	0,8	1,1
				III	17	0,3	0,4	0,5	0,9

[1] Es handelte sich durchwegs um Patienten mit Polyarthritis, Ulcus duodeni und Karzinomen als Diagnose. — [2] Die Medikation bestand schon 4 Tage.

zur schwachsauren Reaktion gebracht, filtriert und weiter behandelt wie in Methode II.

Die gesammelten 12-Stundenharne der Patienten, die nach den obengenannten Methoden aufgearbeitet wurden, zeigten obenstehende Ergebnisse.

Nach den Ergebnissen (Tabelle 4 und 5) ergab sich folgender Schluß: Die geprüften Stoffe (Sympatol, Ephedrin, Pervitin, Codein, Atropin, Scopolamin und Dolantin) erscheinen nach Beibringung in üblicher Dosis nie in größerer Menge im Harn, so daß sie nach Methode I, d. h. nach der Injektion von 1 cm³ Harn je 20 g Maus nie stärker in Wirkung treten werden. Wenn Atropin und Scopolamin ohne Knochen mit Barytwasser (Methode II) ihre Wirkung noch entfalten, so zeigen die Ergebnisse nach Kochen mit Barytwasser (Methode III), daß sie zerstört werden können.

Tabelle 6.

Name	Datum	Dosis mg	Quotient[1] nach Methode		
			I	II	IV
H. D.	10. 11. 47	300			
R. F.	10. 11. 47	300	1,5	1,7	1
W. D.	10. 11. 47	350			

[1] Quotient $= \frac{\text{Maximalwert nach 45 Min.}}{\text{Anfangswert}}$ der Pupillenweite.

Lediglich das Dolantin ließ sich in seiner mydriatischen Wirkung wie zu erwarten, mit keiner der angegebenen Methoden eliminieren. So wurden nun im folgenden die Harne dreier Patienten (Diagnose Mammakarzinom), die eine einmalige Dosis von 300—350 mg Dolantin subkutan erhalten hatten, zuerst mit Chloroform ausgeschüttelt (Tabelle 6). Das Chloroform bewährte sich besser als Äther, da nach Ausschüttelung mit Äther stets eine schwer lösliche Emulsion entstand.

Die dabei angewandte *Methode IV* war folgende: 30 cm³ Harn wurden mit Barytwasser schwach alkalisch gemacht und nach Zugabe von 1 cm³ N/1 NaOH 5 Min. gekocht. Nach dem Erkalten wurde mit gleicher Menge Chloroform einmal $^1/_2$ Min. ausgeschüttelt. Wenn nicht stark geschüttelt wurde, konnten die Schichten stets leicht getrennt werden. Der Verlust von 1—2 cm³ Harn, der sich dabei nie vermeiden ließ, war nie so stark, daß er die Reaktion empfindlich gestört hätte. Dieser Fehler ließ sich jedoch durch Zentrifugieren leicht vermeiden. Die wäßrige Schicht wurde durch Zugabe von N/1 H_2SO_4 wieder bis zur schwachsauren Reaktion gebracht, filtriert und dann mit 1,5 g $NaHCO_3$ bis zum Aufsteigen der ersten Siedeblasen erwärmt. Nach dem Erkalten wurde der Harn mit 60 cm³ Essigester einmal $^1/_2$ Min. kräftig ausgeschüttelt. Der Essigester wurde daraufhin in eine Porzellanschale filtriert und auf dem Wasserbade verdampft. Die Lösung des Rückstandes geschah wie in Methode II und III.

Nach dieser Methode wurden nun die gesammelten 12-Stundenharne der in Tabelle 6 aufgeführten Patienten aufgearbeitet.

Es darf nach diesen Ergebnissen für sicher angenommen werden, daß das ausgeschiedene Dolantin im Harn durch das Chloroform

vollkommen eliminiert werden kann, da das Vorhandensein dieses Stoffes im Harn nach Methode I und II bewiesen war.

b) Die Wirkung des Morphinharnes an der Mäusepupille.

Nachdem jetzt ein Weg gefunden worden war, um etwa störende Einwirkungen auf die Pupille durch andere Stoffe mit mydriatischer Wirkung zu beseitigen, galt es nun festzustellen, bis zu welcher Grenzkonzentration das im Harn ausgeschiedene Morphin sich an der Mäusepupille nachweisen ließ.

Dabei war folgendes zu überlegen: Setzt man z. B. als tägliche Morphindosis 0,02 g Morphin HCl (= 0,015 g Morphin) an, dann können in der Tagesmenge Harn durchschnittlich etwa 1,5—6,0 mg Morphin erwartet werden, was mindestens 1 γ Morphin in 1 cm³ Harn entsprechen würde. Es sind also mindestens 10 cm³ Harn nötig um eine Tagesmenge von 0,02 g Morphin HCl im Harn an der Mäusepupillenreaktion nachzuweisen. Jedoch sind beim Süchtigen weit größere Mengen zu erwarten.

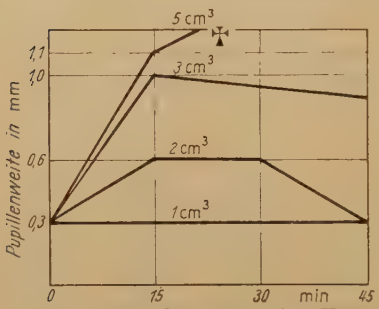


Abb. 4. Einfluß von normalem Harn auf die Mäusepupille.

Auf der Suche nach einer Methode zur Beibringung von Harn an Mäusen ergab sich folgende Beobachtung.

Aus einem Material von 20 Normalharnen gesunder Versuchspersonen zeigte sich, daß 2 cm³ Harn je Maus (20 g) unter die Rückenhaut injiziert, nach 15 Min. die Pupille auf das Doppelte, 3 cm³ Harn je Maus (20 g) nach 15 Min. die Pupille auf das Dreifache öffneten. Alle Mäuse überlebten, sie zeigten keine asphyktischen Eigenschaften und waren in ihrer Motilität nicht beeinträchtigt, wobei 1 cm³ Harn je Maus (20 g) noch keine Pupillenreaktion zur Folge hatte.

Wie Abb. 4 zeigt, war bei den überlebenden Mäusen das Maximum nach 15 Min. erreicht, um danach wieder abzunehmen.

Nach 5 Min. Kochen entfalteten die Normalharne noch dieselbe Wirkung. Bei Ausschüttelung größerer Mengen Harnes (300 cm³) mit Essigester, Äther und Chloroform in saurem (HCl) sowie alkalischem (NaOH, $NaHCO_3$) Milieu, wobei der Rückstand getrennt sauer und alkalisch gelöst wurde, konnte kein mydriatisch wirkender Stoff isoliert werden. Der in Normalharnen enthaltene mydriatische Stoff (Urosympathin ?) geht also nicht in diese Lösungsmittel über.

Um zur Injektion geeignete Lösungen zu erhalten, wurde nach folgender Methode gearbeitet.

9—30 cm³ Harn mit 0,5—1,5 g $NaHCO_3$ bis zum Aufsteigen der ersten Siedeblasen erwärmt, wurden mit 20—60 cm³ Essigester 1—3mal ausgeschüttelt, der Essigester in eine Porzellanschale filtriert und auf dem Wasserbade verdampft. Der Rückstand wurde daraufhin mit 5 Tropfen N/10 HCl gelöst und filtriert. Die Schale und Filter wurden einmal mit 1 cm³ H_2O, das zweitemal mit 0,5 cm³ H_2O nachgespült. Die so erhaltene Lösung wurde mit 5 Tropfen N/10 NaOH wieder neutralisiert und 3 Mäusen injiziert (0,6 cm³ je 20 g Maus).

Beispiele. Patient „N. S." bekam am 23. 7. 47 um 18 Uhr 0,04 g Morphin HCl subkutan, sonst keine Medikamente. Diagnose: Rektumkarzinom, Diurese 950 cm³. Der gesammelte 12-Stundenharn wurde untersucht.

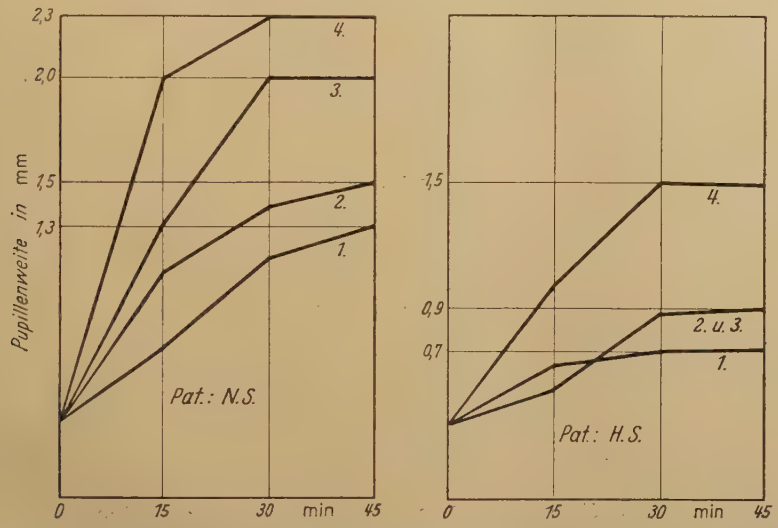


Abb. 5. Einfluß von morphinhaltigem Harn auf die Mäusepupille. *1.* = 3 cm³ Harn einmal mit Essigester. *2.* = 3 cm³ Harn dreimal mit Essigester. *3.* = 10 cm³ Harn einmal mit Essigester. *4.* = 10 cm³ Harn dreimal mit Essigester ausgeschüttelt.

Patient „H. S." bekam 4 Tage lang zweimal 0,01 g Morphin HCl subkutan pro die. An Medikamenten sonst nur Cebiontabletten. Diagnose: Kehlkopfkarzinom, Diurese 1200 cm³. Der Morgenurin wurde untersucht.

Es zeigte sich, daß die 1—3malige Ausschüttelung von 10 cm³ Harn am überzeugendsten war (vgl. Abb. 5).

Um nachzuprüfen, ob und inwieweit das Morphin in wäßriger Lösung oder im Harn durch Kochen mit Barytwasser verändert wird, wurden eine 0,1%ige Morphin-HCl-Lösung sowie der Harn des Patienten R. M., der am 25. 8. 47 abend 0,04 Morphin-HCl subkutan bekommen hatte, untersucht.

30 cm³ Morphinlösung oder Morphinharn wurden mit Barytwasser alkalisch gemacht, 5 Min. gekocht, mit N/1 H_2SO_4 neutralisiert und filtriert. Daraufhin wurde 1,0 g $NaHCO_3$ unter Schütteln zugesetzt, abgekühlt und mit 60 cm³ Essigester dreimal ausgeschüttelt. Der filtrierte Essigester wurde auf dem Wasserbade verdampft. Der Rückstand wurde daraufhin mit 5 Tropfen N/10 HCl

gelöst und filtriert, Schale und Filter einmal mit 1 cm³ H_2O, das zweitemal mit 0,5 cm³ H_2O nachgespült. Die so erhaltenen Lösungen wurden neutralisiert und 3 Mäusen zu je 0,6 cm³ je 20 g injiziert.

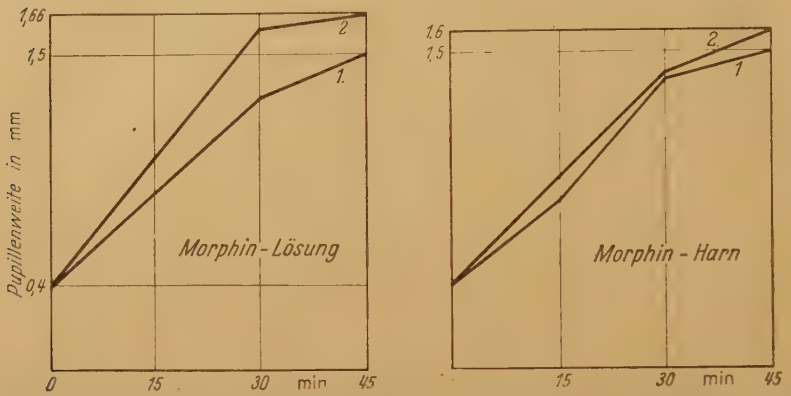


Abb. 6. Einfluß des Kochens mit Barytwasser auf die mydriatische Wirkung morphinhaltiger Lösungen. *1.* Ohne Kochen mit Barytwasser und dreimal mit Essigester ausgeschüttelt. *2.* Mit Barytwasser 5 Min. gekocht und dreimal mit Essigester ausgeschüttelt.

Tabelle 7.

Name[1]	Datum	Dosis Morphin HCl subkutan	Dauer der Medikation	Methode	Mäusepupillenreaktion						Diurese[2]
					Gewicht	Anfangspupille	nach Minuten			Quotient	
							15	30	45		
		g	Tage		g	mm					cm³
M. N.	11. 12. 47	0,02	8	I	16	0,4	0,6	0,5	0,5	1,25	600
				III	15	0,4	0,6	0,7	0,7	1,75	
	12. 12. 47	0,02	9	I	18	0,4	0,8	0,8	0,8	2,0	300
				III	17	0,3	0,6	0,7	0,9	3,0	
R. S.	11. 12. 47	0,02	8	I	16	0,4	0,5	0,5	0,6	1,5	300
				III	21	0,4	0,8	0,8	1,0	2,5	
	12. 12. 47	0,02	9	I	17	0,4	0,4	0,4	0,5	1,24	500
				III	18	0,4	0,6	0,6	0,7	1,75	
L. H.	18. 11. 47	0,02	—	I	16	0,2	0,3	0,5	0,5	2,5	400
				III	16	0,2	0,4	0,5	0,5	2,5	
S. S.	1. 12. 47	0,05	20	I	14	0,4	0,5	0,7	0,6	1,5	200
				III	15	0,4	0,7	0,7	0,9	2,25	
H. N.	2. 12. 47	0,08	3	I	15	0,4	0,9	0,9	1,2	3,0	100
				III	16	0,4	0,8	1,1	1,8	4,5	
				IV	16	0,4	0,8	1,1	1,8	4,5	
L. F.	4. 8. 47	0,1	180	I	17	0,3	0,6	0,6	0,7	2,3	100[3]
				III	16	0,2	0,5	0,8	0,9	4,5	
				IV	16	0,3	0,5	0,8	0,9	3,0	
S. S.	18. 11. 47	0,16	30	I	16	0,4	0,9	0,1	1,5	3,7	80
				III	15	0,4	0,9	1,1	1,5	3,7	
				IV	18	0,3	0,7	0,9	1,5	5,0	

[1] Es handelte sich größtenteils um Patienten mit Karzinom als Diagnose. — [2] Gesammelter Nacht- und Morgenharn. — [3] Kathederharn (zweite Entnahme am Tag).

Aus Abb. 6 ist zu ersehen, daß durch die Aufarbeitung der Morphinlösung und des Morphinharns das Alkaloid vollständig erhalten bleibt. Dabei fiel, wie in zahlreichen weiteren Versuchen, eine stärkere mydriatische Wirkung der gekochten Flüssigkeiten auf.

Die Ergebnisse im Tierversuch und ihre praktische Übertragung auf den menschlichen Harn haben gezeigt, daß es möglich ist, Morphin im Harn von Morphinisten einfach und sicher nachzuweisen. Zum qualitativen Nachweis genügen je Untersuchung 3 Mäuse. Die Methode hat sich soweit vereinfachen lassen, daß sie leicht zu erlernen und anwendbar ist. Wenn hohe Morphindosen im Harn vorliegen, genügt sogar die subkutane Injektion des unveränderten Harnes an der Maus, da nach hoher Morphinkonzentration die Injektion von 1 cm^3 Harn je 20 g Maus einen eindeutigen Nachweis liefert. Als Ergebnis kann über Technik und Auswertung der einzelnen Methoden zum Nachweis von Morphin gesagt werden:

Methode I. Falls der Harn trüb ist und sauer reagiert, werden 3 cm^3 Harn filtriert und mit N/10 Natronlauge neutralisiert, wobei 1 cm^3 je 20 g Maus unter die Rückenhaut gespritzt wird.

Wenn *nach 45 Min.* der Pupillenwert den Quotienten $\left(\frac{\text{Maximalwert}}{\text{Anfangswert}}\right)$ = 3 überschreitet, so ist mit Sicherheit Morphin vorhanden. Das Überschreiten des Quotienten 3 muß abgewartet werden, da die Stoffe Atropin, Scopolamin und Dolantin die Pupille bis zu diesem Wert öffnen können.

Jedoch ist es mit der nachfolgenden Methode III dann möglich, alle mydriatischen Stoffe außer Dolantin auszuschalten.

Methode III. 30 cm^3 Harn werden mit Barytwasser (9—12 cm^3) stark alkalisch gemacht und 5 Min. gekocht. Durch Zugabe von N/1 H_2SO_4 wird der Harn wieder bis zur schwachsauren Reaktion gebracht, filtriert und, mit 1,5 g $NaHCO_3$ unter Schütteln versetzt, bis zum Aufsteigen der ersten Siedeblasen erwärmt. Nach dem Erkalten wird mit 70 cm^3 Essigester einmal $^1/_2$ Min. kräftig ausgeschüttelt. Beim einmaligen Ausschütteln mit Essigester werden zwar nur 60% des Morphins erfaßt, doch genügt diese Menge für die Pupillenreaktion. Der Essigester wird nun in eine Porzellanschale filtriert und auf dem Wasserbade verdampft. Der Rückstand mit 5 Tropfen N/10 HCl gelöst, wird durch einen kleinen Trichter mit Wattebausch filtriert, wobei die Schale und Filter einmal mit 1 cm^3 H_2O, das zweite Mal mit 0,5 cm^3 H_2O nachgespült wird. Die filtrierte Lösung wird nun mit 5 Tropfen N/10 NaOH wieder neutralisiert und 3 Mäusen injiziert (0,6 cm^3 je 20 g Maus).

Selbst nach einer Verabreichung von 0,02 g Morphin HCl = 0,015 g Morphin gelingt es, das Alkaloid noch in 10 cm^3 Harn nachzuweisen.

Mit Methode IV ist es möglich, das Morphin auch neben Dolantin in größter Genauigkeit und Spezifität nachzuweisen.

Methode IV. 30 cm^3 Harn werden mit Barytwasser schwach alkalisch gemacht und nach Zugabe von 1 cm^3 N/1 NaOH 5 Min. gekocht. Nach dem Erkalten wird mit gleicher Menge Chloroform einmal $^1/_2$ Min. ausgeschüttelt (zur Entfernung etwa noch vorhandenen Dolantins). Die wäßrige Schicht wird nun durch Zugabe von N/1 H_2SO_4 wieder bis zur schwachsauren Reaktion gebracht, filtriert und mit 1,5 g $NaHCO_3$ unter Schütteln bis zum Aufsteigen der ersten Siedeblasen erwärmt, und weiter behandelt wie in Methode III.

Es genügt bei sämtlichen Methoden die Ablesung der Pupille am Anfang der Untersuchung und nach 45 Min. Liegt der Quotient bei den Methoden II und IV über 1, dann ist mit Sicherheit nur Morphin vorhanden.

Zusammenfassung.

1. Die Arbeit stellt sich zur Aufgabe, eine einfache biologische Methode zu schaffen, mittels derer die Anwesenheit von Morphin im menschlichen Harn mit Sicherheit nachzuweisen ist.

2. Bei der Überprüfung der chemischen Nachweismethode von Deckert können die Stoffe Chinin, Dilaudid, Dicodid, Eukodal und Codein im Gegensatz zu den Ergebnissen von Deckert als dem Morphin vollkommen ähnlich reagierend erkannt werden.

3. Als neue, die chemische Reaktion von Deckert störenden Stoffe werden das Dolantin und Paracodin erkannt.

4. Verbesserungen der chemischen Nachweismethode nach Deckert mit Silikowolframsäure werden angegeben.

5. Als biologischer Test wird die Erweiterung der Mäusepupille nach subkutaner Injektion der fraglichen Harne verwandt. Bei der Prüfung menschlicher Harne wird gefunden, daß im Normalharn des Menschen sich regelmäßig eine mydriatische Substanz befindet. Untersuchungen zur Erkennung dieses Stoffes (Urosympathin?) sind in Aussicht genommen.

6. Morphin ruft an der weißen Maus eine Pupillenerweiterung hervor, deren Größe von der jeweiligen Morphinmenge abhängig ist. Alle anderen im Harn erscheinenden mydriatischen Stoffe können auf angegebenem Wege ausgeschaltet werden. Für die eindeutige Erkennung von Morphin im menschlichen Harn wird ein einfaches Verfahren beschrieben:

Der mit Barytwasser gekochte Harn wird nach Entfernung des Bariums durch Schwefelsäure und darauffolgender Zugabe von Natriumbicarbonat mit Essigester einmal ausgeschüttelt, wobei der Rück-

stand des Essigesters in Wasser aufgenommen und der weißen Maus unter die Rückenhaut gespritzt wird. Bei Anwesenheit von Morphin ist stets eine eindeutige Pupillenerweiterung zu beobachten.

Diese Methode gestattet bei Aufarbeitung von 10 cm³ Harn je Maus von Personen, die eine einmalige Dosis von 0,015 g Morphin erhalten hatten, das Alkaloid eindeutig zu erkennen.

Literatur.

[1] Orfila: Allg. Toxikol. **2**, 46 (1830). — [2] Lassaigne: J. Pharmacie **4** (1824). — [3] Stas: Bull. Acad. Méd. Belg., Brux. **9**, 304 (1851). — [4] Fröhde: Z. anal. Chem. **5**, 214 (1865). — [5] Marquis: Z. anal. Chem. **38**, 467 (1899). — [6] Pellagrie: Z. anal. Chem. **17**, 373 (1878). — [7] Denigés: Pharmaz. Ztg **1911**, 106. — [8] Husemann: Ann. Chem. **1863**, 305. — [9] Uslar-Erdmann: Ann. Chem. **2** (1862). — [10] Cloetta: Virchows Arch. **35**, 369 (1866). — [11] Kausmann: Inaug.-Diss. Dorpat 1868. — [12] Marmé: Dtsch. med. Wschr. **1883**. — [13] Tolstorff: Ber. dtsch. chem. Ges. **13**, 87. — [14] Donath: Pflügers Arch. **38**, 528 (1886). — [15] Marquis: Dorpat pharm. Arb. **14**, 118 (1896). — [16] Elliasow: Inaug.-Diss. Königsberg 1882. — [17] Mayer, P.: Berl. klin. Wschr. **1899**, 591. — [18] Langer: Biochem. Z. **45**, 239 (1912). — [19] Leinweber: Inaug.-Diss. Göttingen 1883. — [20] Tauber: Arch. exper. Path. (D.) **27**, 336 (1890). — [21] Faust, E. St.: Arch. exper. Path. (D.) **44**, 297 (1900). — [22] Cloetta: Arch. exper. Path. (D.) **50**, 453 (1903). — [23] Rübsamen: Arch. exper. Path. (D.) **59**, 227 (1908). — [24] Valenti: Arch. exper. Path. (D.) **75**, 437 (1914). — [25] Dumez: J. amer. med. Assoc. **122**, 1069 (1919). — [26] Pellini: Arch. int. Med. (Am.) **26**, 279 (1920). — [27] Greenfield: Arch. int. Med. (Am.) **33**, 547 (1924). — [28] Authenrieth: Ber. dtsch. pharm. Ges. **11**, 494 (1901). — [29] Kaufmann, Asser, W. v.: Biochem. Z. **54**, 161 (1913). — [30] Loofs, F. A.: Klin. Wschr. **1929**, 2239. — [31] Takayanagi: Arch. exper. Path. (D.) **102**, 176 (1924). — [32] Takayanagi: Arch. exper. Path. (D.) **102**, 183 (1924). — [33] Fleischmann: Biochem. Ztg **241**, 233 (1931). — [34] Teruuchi-Kai: J. Pharmacol. (Am.) **31**, 177 (1927). — [35] Fry, Light, Torrance and E. W. A. Wolff: Arch. int. Med. (Am.) **44**, 862 (1929). — [36] Pierce-Plant: J. Pharmacol. (Am.) **46**, 201 (1932). — [37] Starkenstein: In A. Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. **2**, 2. Hälfte, S. 821. 1923. — [38] Ellinger-Seeger: Arch. exper. Path. (D.) **174**, 168 (1934). — [39] Panse: Fschr. Ther. 8, 629 (1932). — [40] Deckert: Arch. exper. Path. (D.) **180**, 656 (1936). — [41] Oberst: J. Pharmacol. (Am.) **69**, 240 (1940). — [42] Oberst: J. Pharmakol. (Am.) **74**, 37 (1942). — [43] Hass: Diss. Kiel 1939. — [44] Straub, W.: Dtsch. med. Wschr. **1911**, 14, 62. — [45] Herrmann, O.: Biochem. Z. **39**, 216 (1912). — [46] Pulewka: Arch. exper. Path. (D.) **123**, 259 (1927). — [47] Rassers: Ndld. Tschr. Geneesk. **2**, 211 (1915). — [48] Jensen-Rumry: J. Pharmacol. (Am.) **11**, 178 (1918). — [49] Okuda-Sôzaburô: Ber. Physiol. **62**, 441 (1931). — [50] Keil-Kluge: Arch. exper. Path. (D.) **174**, 493 (1934). — [51] Macht: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **17**, 100 (1920). — [52] Juul: Arch. internat. Pharmacodynam. **62**, 69 (1939). — [53] Tremonti: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **3**, 393 (1928). [54] Fichtenberg-Dénisé-Lèvy: C. r. Soc. Biol. **130**, 312 (1939). — [55] Kahane-Lèvy: C. r. Soc. Biol. **130**, 309 (1939). — [56] Henderson-Grahan: J. Pharmacol. (Am.) **26**, 469 (1926). — [57] Kinukowa: Tohoku J. exper. Med. (Jap.) **22**, 174 (1933). [58] Mintscheff: Graefes Arch. **129**, 379 (1933). — [59] Pulewka: Arch. exper. Path. (D.) **168**, 307 (1932). — [60] Girndt-Evers: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 280 (1940). — [61] Girndt: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 142 (1936). — [62] Kratter:

Vjschr. gerichtl. Med. **44**, 52 (1886). — [63] Dragendorff: Ermittlung von Giften. 1888. — [64] Wiechowski: Arch. exper. Path. (D.) **46**, 155 (1901). — [65] Goodmann-Gilman: The Pharmacol. Basis of Therapeutics New York 1943. — [66] Kobert-Sohrt: Arch. exper. Path. (D.) **22**, 396 (1887). — [67] Windscheid: Dtsch. Arch. klin. Med. **64**, 277 (1899). — [68] Cushny: In A. Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. II, 2. Hälfte, S. 654. 1924. — [69] Thiel: Arch. exper. Path. (D.) **130**, 313 (1942). — [70] Guggenheim-Löffler: Biochem. Z. **72**, 325 (1916). — [71] Loewe: Z. exper. Med. **6**, 335 (1918). — [72] Ball-Clark: Proc. nat. Acad. Sci. (Am.) **17**, 347 (1931). — [73] Weinstein-Manning: Science (N.Y.) **86**, 19 (1937). — [74] Seitz: Z. exper. Med. **105**, 559 (1939). — [75] Marquard: Klin. Wschr. **1938**, 1445. — [76] Bressler: Diss. Leipzig 1937. — [77] Blaschko-Hermann-Richter-Schlossmann: J. Physiol. (Brit.) **90**, 1 (1937). — [78] Blaschko: J. Physiol. (Brit.) **93**, 7 (1938). — [79] Blaschko-Schlossmann: J. Physiol. (Brit.) **98**, 130 (1940). — [80] Lumière-Meyer: C. r. Soc. Biol. **128**, 680 (1938). — [81] Beyer-Skinner: J. Pharm. (Am.) **68**, 419 (1940). — [82] Rifàtwachdani: Biochem. Z. **54**, 83 (1931).

Aus dem Strahleninstitut des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G., Forschungsanstalt Insel Riems bei Greifswald (Prof. Dr. H. Ruska).

Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran.

Von

B. Lindemann.

Mit 13 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Juni 1948.)

Eine allgemein überzeugende Klärung der Meinungsverschiedenheiten über die Bauweise der roten Blutkörperchen war bisher mit den Methoden der lichtmikroskopischen-histologischen Technik im weitesten Sinne und mit den experimentellen Methoden der Physiologie nicht zu erzielen. Im allgemeinen stehen sich 3 Auffassungen über die Erythrozytenstruktur gegenüber, ohne daß sich eine Anschauung hätte durchsetzen können. Nach der ältesten anatomischen Vorstellung (Leuwenhoek u. a.) wurde die rote Blutzelle als Bläschen mit flüssigem Blutfarbstoffgehalt beschrieben. Gegenüber dieser ältesten Auffassung stellten sich Brücke, Rollet u. a. den Erythrozyten als ein Maschengefüge mit eingelagertem Hämoglobin vor. Eine vermittelnde Stellung nahmen zumeist die Kombinationstheorien ein und erklärten das Zellgefüge als ein mit einer Membran oder Grenzschicht umkleidetes Maschenwerk, welches die formbestimmenden und formerhaltenden Strukturelemente im Erythrozyten darstellen sollte.

Jahre hindurch war die Frage der Erythrozytenmembran der Gegenstand einer Kontroverse. Auf das Für und Wider, das nur von historischer Bedeutung ist, soll nicht weiter eingegangen werden. Kurz, alle möglichen Vorstellungen histologischer Begrenzung tierischer Zellen sind von der Krusta, Hülle zur Membran oder Grenzschicht aus zähflüssigem Ektoplasma, von der verdichteten Randschicht, Pellicula, Plasmahaut bis zum Adsorptionsphänomen entwickelt und vertreten worden.

Eine klare Entscheidung brachten hier erst die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Erythrozyten, wodurch die Grenzschicht der roten Blutzelle als Membran im Sinne streng zytologischer Definition nachgewiesen werden konnte. Damit war die Ballonstruktur des Erythrozyten endgültig bewiesen. Die Existenz der Erythrozytenmembran steht heute auch nicht mehr zur Diskussion, nur über ihren Feinbau gehen die Meinungen noch auseinander. Die einen (Schmitt,

Bear, Ponder, Schmidt) nehmen einen lamellären Schichtbau aus Grenzflächenlipoiden und Stromatineiweiß an, die anderen (Bechhold, Mond und Hoffmann) eine Netzstruktur aus einem Eiweißgerüst mit eingelagerten Lipoiden. Letzterer Ansicht schließt sich auch Wolpers auf Grund elektronenoptischer Untersuchungen an unfixierten mit Lipoidlösungsmitteln extrahierten Erythrozytenmembranen an und beschreibt die Erythrozytenhülle als ein Gerüstwerk, deren formbestimmende Bestandteile ein Eiweißnetz aus langen Stromatinfäden mit in den Netzmaschen eingelagerten für die Permeabilitätsvorgänge so wichtigen Lipoiden darstellt. Demgegenüber kommt Jung bei der Analyse elektronenmikroskopischer Bilder zu der Vorstellung eines Schichtbaues und hält die Grenzschicht der roten Blutzelle in Anlehnung an die üblichen Vorstellungen über die Struktur der Randschicht protoplasmatischer Gebilde für eine Krustamembran, die außen von einer monomolekularen Lipoidschicht bekleidet ist und sich aus den doppeltbrechenden leicht zu denaturierenden Stromatineiweißmizellen aufbaut und nur nach außen einseitig scharf begrenzt ist, während die Innenfläche gegen das Zellinnere schnell an Dichte abnimmt. Die Krustamembran enthält Fermente und geringe Mengen von Hämoglobin. In denaturierten Membranen geht die Aktivität der eingeschlossenen Fermente und die Löslichkeit des anhaftenden Hämoglobins verloren.

Wie im einzelnen noch auf Grund der elektronenmikroskopisch erhobenen Befunde, die an Hämolyseresten einer Hypotonie-Hämolyse, welche einfachen physikalischen und chemischen Einflüssen unterworfen wurden, nachgewiesen wird, spricht für die Annahme einer Schichtenfolge die größere Wahrscheinlichkeit, aber an der Membranvorstellung im Sinne streng zytologischer Definition, d. h. zweiseitig scharfer Begrenzung, muß bei der reifen kernlosen im peripheren Blut kreisenden roten Blutzelle festgehalten werden.

Für die morphologische Strukturanalyse erschien uns der Hämolyserest einer Hypotonie-Hämolyse, die Erythrozytenmembran, als ein besonders geeignetes Untersuchungsobjekt, da wir von den Hämolysestudien wissen, daß die Erythrozytenmembran in der Regel sowohl in mechanischer als auch in kolloidchemischer Hinsicht nicht alteriert ist und daher funktionell und morphologisch weitgehend intakt bleibt. Die verschiedenen physiologisch vorkommenden Gestaltformen des Erythrozyten werden ausschließlich durch funktionelle Zustandsänderungen der Membran hervorgerufen und können, solange sie reversibel sind, als biologischer Test für die Unversehrtheit einer Membran angesehen werden. So ist z. B. der bedingt reversible Gestaltwandel des Erythrozyten in hypotonischen Systemen von der Scheiben- zur Kugelform als Folge eines Spannungswechsels der Membran zu deuten,

die unter bestimmten Bedingungen mit einer eigentümlichen Zustandsänderung reagiert und deren natürliche Form die gespannte bikonkave Scheibe darstellt, die schätzungsweise eine Energie von 10^{-5} erg aufbietet (Ponder), um den Erythrozyten die physiologische für die sauerstoffübertragende Funktion so wichtige Gestaltform zu erhalten.

Die unfixierte hämoglobinleere Erythrozytenmembran ist ein äußerst zartes und vulnerables Gebilde und besteht nahezu aus 80% Stromatin und 20% Lipoiden, die den gesamten Bestand der Zelle an

Abb. 1. Erythrozytenmembran in der Kugelform, unfixiert. El. opt.: 1:8500.

Lipoiden ausmachen. Das Stromatin nimmt etwa 4% des Gesamtproteingehaltes der roten Blutzellen ein und ist gewissermaßen ein Protein sui generis. Es unterscheidet sich durch seinen niedrigen Stickstoffgehalt und den Gehalt an Aminosäuren Arginin und Histidin vom Hämoglobin und durch den anderen Gehalt von Tyrosin und Tryptophan vom Fibrin und Globulin. Der isoelektrische Punkt des Stromaproteins liegt bei einem p_H von 5,5 (Jorpes).

In der unfixierten schlaffen Sphäroform gleicht die Erythrozytenmembran einer faltenbildenden Ballonhülle (Abb. 1) und in der unfixierten straffen Scheibenform einer platten Scheibe, in deren Zentrum zuweilen kleine Faltenwürfe auftreten (Abb. 2). Die vereinzelt unregelmäßig auftretenden Porenbildungen an den unfixierten Membranen sind als Artefakte anzusprechen. Osmiumimprägnierte Membranen, d. h. mit OsO_4 fixierte Membranen, treten auf dem Leuchtschirm im Übermikroskop kontrastreicher hervor. Die scharfkantigen Falten der Sphäromembran (Abb. 3) zeigen deutlich den Hüllencharakter. Die Abb. 4 gibt eine osmierte Membran in der Scheibenform wieder, die

ein physiologisch vorkommendes sog. Heinz-Körperchen erkennen läßt. Das in der Histologie in der üblichen 4—10%igen Konzentration verwandte Formol fixiert und hämolysiert die Erythrozyten. Die mit

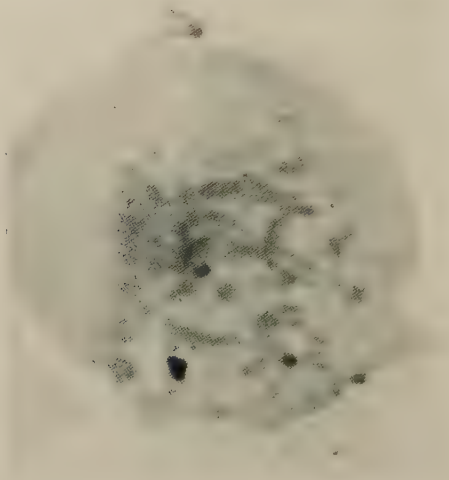


Abb. 2. Erythrozytenmembran in der Scheibenform, unfixiert. El. opt.: 1:8500.

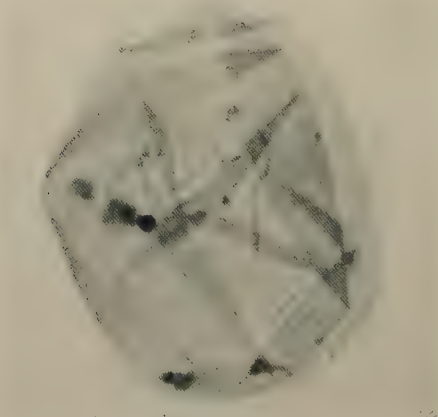


Abb. 3. Erythrozytenmembran in der Sphäroform, Osmiumfixation. El. opt.: 1:8400.

Formol fixierten Erythrozytenmembranen (Abb. 5) gleichen einer homogenen strukturlosen Gelatinescheibe, an denen nur die Membranduplikaturen der Faltenwürfe deutlicher hervortreten. Rißbildungen werden an osmotisch hämolysierten Zellen in den seltensten Fällen beobachtet und sind zumeist artefiziell entstanden. An einer solchen gerissenen Membran kommt der Hüllencharakter besonders gut zur

Darstellung (Abb. 6). Durch die unterschiedliche Schichtdicke lassen sich die beiden Vorder- und Hinterwände klar abgrenzen und geben

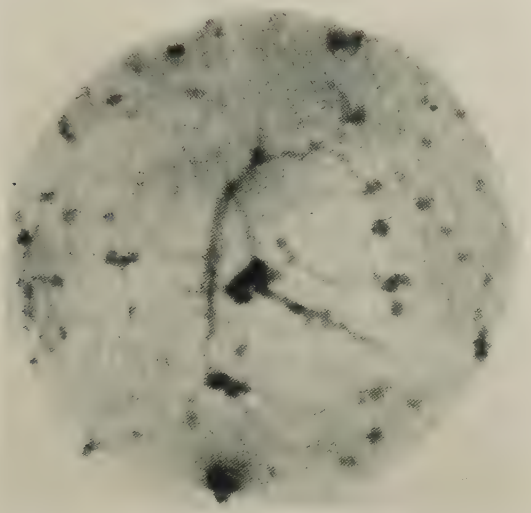


Abb. 4. Erythrozytenmembran in der Scheibenform mit HEINZ-Körperchen, Osmiumfixation. El. opt.: 1:7500.

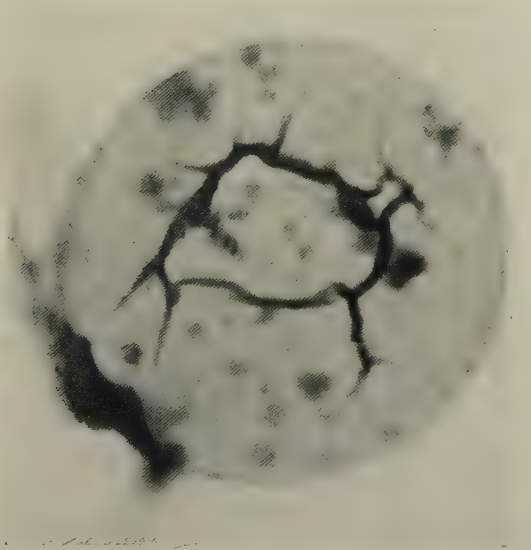


Abb. 5. Erythrozytenmembran. 4% Formolfixation. El. opt.: 1:8500.

eine gute Vorstellung von dem Raumgebilde. Solche fixierten Hämolysereste haben im trockenen Zustand im Vakuum eine Wanddicke

von etwa schätzungsweise 20 mμ (Wolpers), was etwa der Dicke des als Objektträger verwandten Kollodiumfilmes entspricht.

Von besonderer Bedeutung für die morphologische Strukturanalyse sind die nachfolgenden Abbildungen, da an ihnen die Schichtenfolge als das der Erythrozytenmembran zugrunde liegende Bauprinzip nachgewiesen werden kann. Tritt als Folge der osmotischen Hämolyse eine

Abb. 6. Geplatzte Erythrozytenmembran, Osmiumfixation. Aufnahme: Dr. H. Ruska. El. opt.: 1:8000.

kolloidchemische Alteration der Membran ein und geht die Lipoidhülle in Lösung, wie es vereinzelt an den Hämolyseresten osmotisch hämolysierter Zellen zu beobachten ist, kommt an den fixierten Membranen ein Trabekelwerk aus denaturiertem Stromaprotein zutage (Abb. 7). Die zahlreich von dieser Membran gebildeten dreieckförmigen und zipfligen Fortsätze geben angedeutet eine beginnende Stechapfelform des Erythrozyten wieder und sind der Beweis dafür, daß diese in so vielfältigen Variationen vorkommenden Gestaltformen des Erythrozyten durch Veränderungen der Membran hervorgerufen werden.

Das Lipoid, summarisch gesprochen, bildet häufig als Folge der Auftrocknung und Fixation an den Hämolyseresten am Rande und in

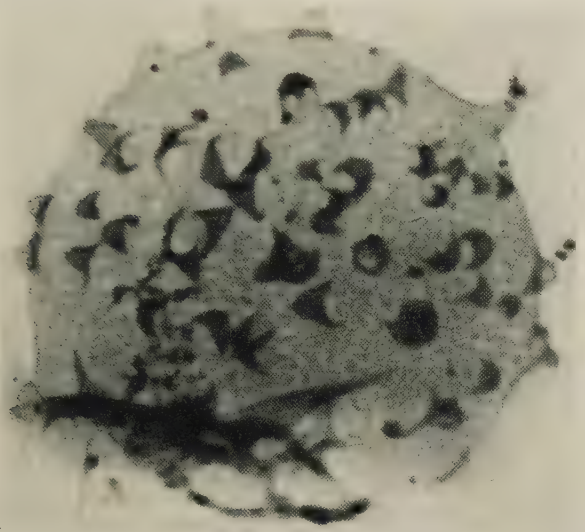


Abb. 7. Lipoidfreie Erythrozytenmembran. Stromatinskelett. Osmiumfixation. El. opt.: 1:8500.

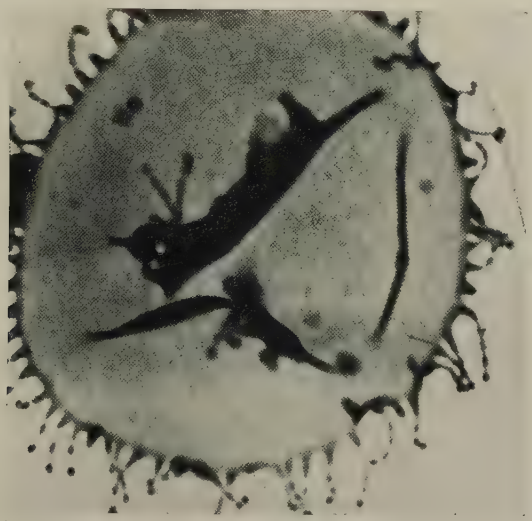


Abb. 8. Perlschnurartige Fortsätze und Myelinfiguren der Lipoidhülle. Osmiumfxation. El. opt.: 1:8500.

den Falten perlschnurartige Ausläufer, in denen auch Hämoglobin eingeschlossen sein kann, und Myelinfiguren, wie sie an der Membran nach einer Aqua dest.-Hämolyse gezeigt werden können (Abb. 8). In

NaCl-Suspensionen werden diese Vorgänge noch begünstigt. Die Lipoidschläuche auf der nachfolgenden Abbildung (Abb. 9), welche an der Erythrozytenmembran, die nach abgeschlossener Hämolyse 3 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert war, aufgetreten sind, können nur gedeutet werden, wenn wir eine Lipoidhülle voraussetzen und müssen daher als ein zwingender Beweis für eine

Abb. 9. Lipoidschläuche der Erythrozytenmembran, Osmiumfixation. El. opt.: 1:18000.

solche Lipoidaußenschicht an der Erythrozytenmembran angesehen werden. Das schnell in die Zelle eindringende eiweißdenaturierende 38%ige Formol fixiert die Zelle und erzeugt eine Plasmolyse (Abb. 10). Die Membran und der Zellinhalt erscheinen als 2 getrennte Bestandteile. Bei diesem Fixationsprozeß hydrolysiert und extrahiert Formol wahrscheinlich die Lipoide; die Lipoidhülle geht in Lösung und ein grobmaschiges Eiweißskelett kommt zum Vorschein.

Eine isolierte Darstellung der Lipoidhülle ist bisher nicht gelungen. Nach kurzer Einwirkung proteolytisch wirkender Agenzien zerfallen die Membranstrukturen. Die Abb. 11 zeigt eine unfixierte nach kurzer Behandlung mit Essigsäure sich auflösende Erythrozytenmembran.

Die elektronenmikroskopischen Befunde an osmotisch hämolysierenden Zellen machten es wahrscheinlich, daß das Hämoglobin im Erythrozyteninnern polymolekulare Assoziate bildet, die als Ausdruck

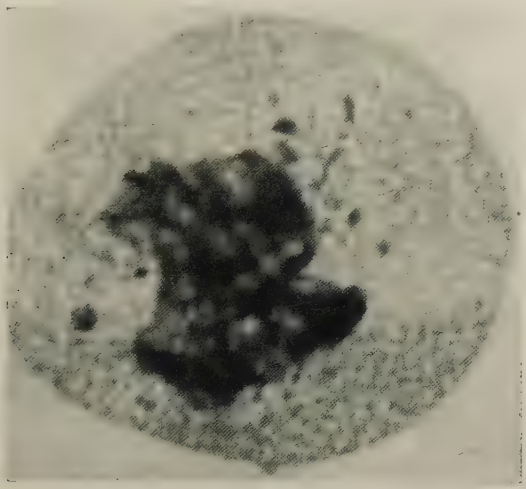


Abb. 10. Partiell hämolysierter Sphäronyt. 38% Formolfixation. El. opt.: 1:8500.

Abb. 11. Zerfallender, unfixierter Hämolyserest nach 15 Min. Eisessigeinwirkung. El. opt.: 1:8500.

des physiologischen, geordneten molekularen Innengerüstes anzusehen sind. Die Abb. 12 gibt eine lipoidfreie Erythrozytenmembran wieder, in der ein Kranz von Hämoglobinassoziaten nicht diffusibler Größe liegt. In der nächstfolgenden Abb. 13 erkennen wir in der angedeuteten Glockenform einen partiell hämolysierten Erythrozyten,

der dem vorangehenden beschriebenen Gebilde in gewisser Weise gleicht, aber eine intakte Membran aufweist.

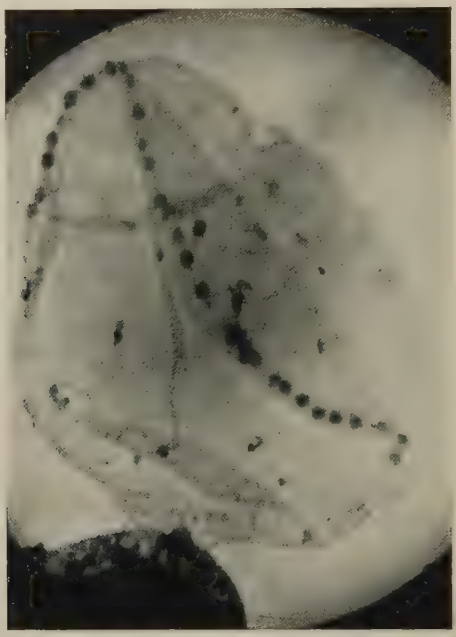


Abb. 12. Lipoidfreie Erythrozytenmembran mit Hämoglobinassoziaten nicht diffusibler Größe. Osmiumfixation. 1:8500.

Abb. 13. Partiell hämolysierter Erythrozyt mit angedeuteter Glockenform. Osmiumfixation. El. opt.: 1:8500.

Je nach dem Elektrolytgehalt im Suspensionsmedium nehmen partiell hämolysierte Erythrozyten, d. h. Erythrozyten, die in konzentrierten Erythrozytensuspensionen mit kleinen Außenvolumina nur

einen Teil ihres Zellinhaltes verloren haben, Kugel- oder Scheibenformen an, in denen sich der Zellinhalt im Zentrum oder am Rande ansammelt. In der partiell hämolysierten Kugelform des Erythrozyten bleibt eine schmale Randzone und in dem partiell hämolysierten Scheibenerythrozyten entsprechend dem Hämolysegrad die zentrale Zone im Zellinnern hämoglobinfrei. Dieses bedingt auftretende Wechselspiel von der Kugel- zur Scheibenform ist ein Beweis dafür, daß das Hämoglobin im Zellinnern beweglich und weder adsorbiert noch im Stroma gelöst ist.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die Hülle der reifen kernlosen im peripheren Blut kreisenden roten Blutzelle des Menschen eine Membran im Sinne streng zytologischer Definition, d. h. zweiseitig scharf begrenzt, ist. Am Hämolyserest einer Hypotonie-Hämolyse, der Erythrozytenmembran, läßt sich elektronenmikroskopisch eine Schichtenfolge ableiten. Die Außenschicht wird von den Lipoiden gebildet. Das nachfolgende Membranskelett besteht aus der eigentlichen Trägersubstanz, dem langfädigen Stromatineiweiß, welches die formerhaltenden Strukturelemente bildet. Im trockenen fixierten Zustand beträgt die Wanddicke der Membran schätzungsweise 20 mμ.

Literatur.

Bechhold, H.: Münch. med. Wschr. **1921**, 127; **1931**, 127. — Beumer, H. u. M. Bürger: Arch. exper. Path. (D.) **71**, 311 (1913). — Boehm, G.: Biochem. Z. **282**, 32 (1935). — Borries, B. v. u. E. Ruska: Verh. Ges. dtsch. Naturf. **1938**, 72. — Erg. exakt. Naturw. **19**, 237 (1940). — Collander, C.: Ber. physiol.-ökon. Ges. Königsberg **69**, 251 (1937). — Curtis, H. J.: J. Physiol. (Brit.) **19**, 929 (1936). — Danielli, J.: J. Physiol. (Brit.) **19**, 19 (1935). — Erickson, B. N. and H. H. Williams, S. S. Bernstein, J. Avrine, R. L. Jones and J. G. Macy: J. biol. Chem. (Am.) **122**, 515 (1938). — Frey-Wyssling, A.: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin 1938. — Umschau **1940**, 500. — Fricke, H.: J. Physiol. (Brit.) **9**, 137 (1925). — Gorter, E. u. F. Grendal: J. exper. Med. (Am.) **41**, 439 (1925). — Jorpes, E.: Biochem. J. (Brit.) **26**, 1488. — Jung, F.: Klin. Wschr. **1942**, 917; **1947**, 459. — Lepeschkin, W. W.: Kolloidchemie des Protoplasmas, 2. Aufl. Dresden-Leipzig 1938. — Leuwenhoek: Philos. Trans. **1674**. Ref. Henle. — Lindemann, B.: Arch. exper. Path. (D.) (im Druck). — Mond, R.: Pflügers Arch. **217**, 618 (1927). — Mond, R. u. F. Hoffmann: Pflügers Arch. **219**, 467 (1928). — Natansohn, A.: Jb. Bot. **39**, 607 (1904). — Overton, B.: Vierteljahrhundert-Schriften der naturforschenden Gesellschaft Nr 40, 1. Zürich 1895. — Ponder, E.: Protoplasma (D.) **6** (1934). — Romeis, B.: Taschenbuch der mikroskopischen Technik. München u. Berlin 1943. — Ruhland, W.: Jb. Bot. **51**, 376 (1912). — Ruhland, W. u. C. Hoffmann: Planta (Berl.) **1**, 1 (1925). — Ruska, H.: Dtsch. med. Wschr. **1941**, 281. — Seifritz, W.: Protoplasma (D.) **1**, 346 (1927). — Schmidt, W. J.: Kolloid-Z. **85**, 137 (1938). — Schmitt, F. O., R. Bear u. E. Ponder: J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) **9**, 89 (1936). — Schwann, Th.: Mikroskopische Untersuchungen usw. 1939. — Studnicka, F. K.: Z. Zellforsch. **2**, 408 (1925). — Weidenreich: Pflügers Arch. **132**, 143 (1910). — Weil, A.: J. biol. Chem. (Am.) **83**, 601. — Winkler, K. A. u. H. S. Bungenberg de Jong: Arch. néerld. Physiol. **25**, 431 (1941). — Wolpers, C.: Naturw. **28**, 416 (1941). — Wolpers, C. u. H. Ruska: Klin. Wschr. **1939**, 1077. — Zwickau, K.: Diss. Berlin 1941.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Behrens).

Eine Methode der fortlaufenden Blutdruckregistrierung an freigelegten, nicht eröffneten Arterien.

Von

Behrend Behrens und Günter W. Jacobi.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Juli 1948.)

Für tierexperimentelle Untersuchungen über Kreislaufwirkungen ist die fortlaufende Registrierung der Druckverhältnisse und ebenso der Strömungsgeschwindigkeit erforderlich. Die Thermostromuhr nach Rein gestattet ohne wesentliche Störung der Kreislaufverhältnisse die Bestimmung der zuletzt genannten Größe. Verfahren, die auch die Registrierung der Druckverhältnisse ohne Eröffnung des Gefäßes gestatten, sind nur vereinzelt angegeben. Sie haben sich wegen der komplizierten Apparaturen nicht eingebürgert (Methode von Wagner[1] Pelotte mit nachlaufendem Druck, sowie Gomez, Mauricio und Langevin[2] mit Hilfe des Piezo-Effektes, Mies[3], Matthes[4] mit elektrischer Ventilsteuerung). Wir haben uns die Frage vorgelegt, ob mit den heutigen verfeinerten Meßmethoden dieses Problem nicht sehr einfach dadurch zu lösen sei, daß eine sehr starke Feder einen Stift mit kleiner Stempelfläche ein auf einer starren Unterlage liegendes Gefäß leicht komprimiert. Jede Druckänderung in demselben würde eine minimale Änderung der Durchbiegung der Feder zur Folge haben. Die Messung und Registrierung dieser Längenänderung ist heute kein Problem und kann auf die verschiedenste Weise gelöst werden. Wir fanden als einfach die Vergrößerung der Ausschläge mit einem Mikroskop und photoelektrische Registrierung der Veränderung.

Bei der von uns entwickelten Methode gehen wir von Überlegungen aus, die Hürthle[5] für die blutige Messung angestellt hat. Die inkonstante Empfindlichkeit der Gummimembranmanometer hat Veranlassung gegeben, die Elastizität des Gummis durch die viel konstantere Elastizität von Metallfedern zu ersetzen. Hürthle läßt den Gefäßdruck auf eine Gummimembran wirken, gegen die eine starke Feder drückt. Die Deformierung der elastischen Feder gibt dabei das Maß für die Druckveränderungen.

Es wurde überlegt, ob nicht auf diese Weise an Stelle der entspannten Gummimembran direkt die entspannte uneröffnete Gefäßwand gesetzt werden kann. Es zeigte sich, wie auch die weiter unten abgebildeten

Eichkurven ergeben, daß dies sehr gut möglich ist. Die Verbiegung der Feder folgt bei richtiger Wahl der Größe der Stempelfläche und der Elastizität der Feder absolut den Druckänderungen im Gefäß. Eine mechanische Vergrößerung der Federausschläge, etwa durch Hebel, würde die Einführung verhältnismäßig großer Massen in das bewegte System sowie kraftverschluckender Gelenke erforderlich machen. Dadurch würde sich eine starke Vergrößerung der Trägheit und damit eine Minderung der Empfindlichkeit ergeben. Durch die Anwendung eines Mikroskopes ist nun die Möglichkeit gegeben, die geringen Ausschläge durch entsprechende Einstellung der Vergrößerung optisch, d. h. trägheitslos, zu vergrößern, ohne daß die übrigen Eigenschaften

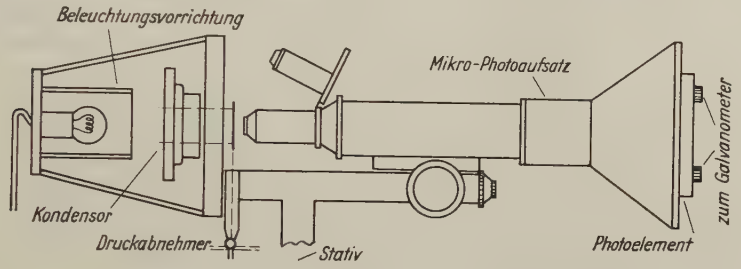


Abb. 1.

der Apparatur beeinflußt werden. Die geringen Ausschläge des Federstempels werden auf eine Fahne übertragen, die dem Stempel aufsitzt und je nach Ausschlag das Blickfeld im Mikroskop mehr oder weniger verschattet.

Es gilt nun, die durch wechselnde Verschattungen entstehenden Lichtschwankungen aufzunehmen, was mit Hilfe eines Photoelementes möglich ist. Die dadurch hervorgerufenen Stromschwankungen im Photoelement können durch direkte Verbindung mit einem Spiegelgalvanometer von entsprechender Empfindlichkeit und Eigenfrequenz registriert werden. Die Lichtzeigerausschläge des Spiegels werden als Ausdruck der Blutdruckänderungen auf einem Photokymographion verzeichnet.

In schematischer Darstellung zeigt Abb. 1 das Wesentliche der Anordnung. Sie besteht in der Hauptsache aus Beleuchtungsvorrichtung, mechanischem Druckabnehmer, Mikroskop, mikrophotographischem Aufsatz mit Photoelement und Stativ.

Als Lichtquelle wurde eine Mikroskopierlampe benutzt, die fest an dem Objekttisch montiert wurde unter Beibehaltung des Kondensors. Sie war mit einer Speziallampe von 6 V/35 W ausgerüstet und wurde aus einem Transformator gespeist. Damit konnte auch bei stärksten Vergrößerungen für das Photoelement eine ausreichende Lichtstärke erzielt werden. Die Lampe war durch einen Schiebewiderstand in ihrer Intensität veränderlich geschaltet. Störende Schwankungen durch den benutzten Wechselstrom waren für die Messungen belanglos.

Die praktische Konstruktion des Druckabnehmers wird am besten an Hand der Abb. 2 klar.

Auf der Objektseite des Tisches eines Mikroskopes ist der aus Messing verfertigte Halter (*H*) im Punkte *D* drehbar angeschraubt. Durch die Klemmschraube (*Kl*) wird eine 80 mm lange und 18 mm breite und 0,8 mm dicke Blattfeder (*Bl*) fest an den Halter geklemmt. Die Blattfeder besteht aus hochwertigem Stahl und besitzt praktisch vollkommen elastische Eigenschaften. Eine Verbiegung wird bei Aufhebung des einwirkenden Druckes in vollem Umfange wieder rückgängig. Die Erscheinung der Nachdehnung ist dabei völlig belanglos. Von der Beschaffenheit der Feder, d. h. von ihrer Spannung, Dicke und Länge, ist bis zu einem gewissen Grade die Empfindlichkeit (worunter nach O. Frank der Ausschlag des Registrierpunktes zu verstehen ist) und das Auflösungsvermögen (Frequenzbereich) der Apparatur abhängig. Eine Vorstellung von den elastischen Eigenschaften der von uns benutzten Feder ergibt am besten eine Belastungsprobe. Dabei

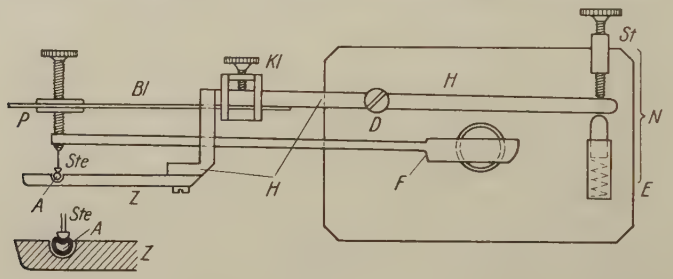


Abb. 2.

ergab eine Belastung mit 20 g eine Verbiegung der Feder um 1 mm. An ihrem anderen freien Ende trägt die Feder den Stempel (*Ste*), dessen Fläche einen Querschnitt von 0,8 mm² besitzt und durch Schraubvorrichtung im Abstand von der Feder verstellt werden kann. Am Halter befindet sich ferner die 30 mm lange Zunge (*Z*) mit einer halbkreisförmig eingefrästen Rinne (*R*) von 4 mm Länge und 1,5 mm lichtem Durchmesser, der etwa einem durchschnittlichen Gefäßquerschnitt entspricht und in welche das freipräparierte Gefäß gelegt wird. (*A*) ist die Arterie im Querschnitt, deren Innendruck fortlaufend gemessen werden soll.

Am Stempel ist die Fahne (*F*), die aus 0,5 mm dickem Blech gefertigt ist, in (*P*) fest mit dem Stempel und der Stellvorrichtung verbunden. Das freie Fahnenende bewegt sich über dem Brennfleck in der Mitte des Objekttisches.

(*N*) stellt eine Stellvorrichtung dar, mit welcher beliebig und bequem die Stellung der Fahne und damit die Stellung des Nullpunktes verändert werden kann. Die Änderung geschieht durch Drehung der Stellschraube (*St*), welche die Verlängerung des Halters gegen eine starke Feder (*E*) drückt.

Es hat sich bei den Versuchen als zweckmäßig erwiesen, das Fahnenende und die Frontseite der Objektivlinsenhalterung zu berußen, um störende Lichtreflexwirkungen der blanken Metallteile auszuschalten.

Als Mikroskop benutzten wir ein normales Zeiß-Mikroskop mit vierteiligem Objektivrevolver (lineare Vergrößerung 50—100mal). Auf dem Tubus des Mikroskopes war ein mikrophotographischer Aufsatz von Zeiß gesetzt, an dem seitlich eine Mattscheibe angebracht war. Hierdurch war eine bequeme Scharfeinstellung und Nullpunktjustierung gewährleistet. Das sonst erforderliche lästige Auswechseln von Mattscheibe und Photoelement wurde dadurch vermieden.

Für die Aufnahme der Lichtschwankungen diente ein Photoelement vom Selensperrschichttyp mit großer Fläche, Typ S 75 nach LANGE, welches an einer ausgeschnittenen Metallkassette angeschraubt war. Die ausreichende Stromkonstanz dieses Photoelementes, selbst bei längerer Versuchsdauer, machte eine ursprünglich geplante Kompensationsschaltung mit 2 Zellen überflüssig. Die runde Fläche des Photoelementes war durch eine Pappscheibe quadratisch abgeblendet.

Die aufgezählten Apparateteile wurden nach Einstellung der optischen Achsen der Lichtquelle, des Mikroskopes und des Mikrophotoaufsatzes fest miteinander verbunden und an einem Stativ befestigt. Die Anordnung ist dadurch ein für allemal zentriert und kann in jeder Weise senkrecht und waagerecht um den Stativfuß

Abb. 3.

verschoben und festgestellt werden. Gleichzeitig wird eine bequeme Einstellung des Druckabnehmers zum Versuchstier ermöglicht.

Die Schwankungen des Federstempels, die sich der Fahne mitteilen, werden durch das Mikroskop in vergrößerte Lichtschwankungen umgesetzt, wodurch in dem Photoelement Stromschwankungen hervorgerufen werden. Diese Photostromschwankungen wurden einem Spiegelgalvanometer, das eine Stromempfindlichkeit von 1,9 . 10^{-8} besaß, zugeführt. Im Galvanometerkreis befand sich zur Veränderung der Dämpfung ein variabler Widerstand (Rheostatenkasten) von 10 bis 1000 Ohm.

Die Lichtzeigerausschläge des Manometers gelangten auf einem Photokymographion in Lichtpunktschreibung zur Aufzeichnung.

Abb. 3 zeigt die ganze Anordnung der Apparatur (Spiegelgalvanometer und Photokymographion sind fortgelassen).

Messungen mit der Apparatur.

Die folgenden Kurven zeigen die Anwendbarkeit der oben beschriebenen Anordnung. Es handelt sich um Kurven, die bei Kaninchen und Katzen an der freigelegten Carotis gewonnen wurden.

Nach einem Hautschnitt von 4—5 cm Länge wurde das Gefäß nach sorgfältiger Präparation in die dazu vorgesehene Rinne, unter Anheben des mit der Feder verbundenen Stempels gelegt. Der Stempel komprimiert das Gefäß zweckmäßig um $^1/_2$—$^1/_3$ seines Volumenquerschnittes. Die Präparation und das Aufsetzen des Stempels muß sehr schonend erfolgen, um Endothelschädigungen zu vermeiden. Auch muß beachtet werden, daß das Gefäß an den Enden der Rinne nicht abgeknickt wird.

Wir haben in vielen Versuchen festgestellt, daß bei sauberem Arbeiten und nach stundenlanger Versuchsdauer die Arterienwand nicht wesentlich geschädigt ist. Histologische Schnitte des komprimierten Arterienstückes bei einem nachfolgend getöteten Kaninchen zeigten nur unwesentliche Blutaustritte der vasa vasorum. Endothelschädigungen, die zur Thrombenbildung Anlaß gegeben hätten, wurden nicht beobachtet.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Hautwunden mit Klammern geschlossen. Sie heilten stets komplikationslos.

Die folgenden Abb. 4 und 5 zeigen normale Blutdruckkurvenausschnitte, bei denen die Geschwindigkeit des Kymographionablaufes bzw. die Empfindlichkeit (Ausschlaghöhe des Galvanometers) variiert wurde.

In Abb. 6 ist bei sehr großer Kymographiongeschwindigkeit versucht worden, den Druckablauf einzelner Pulse zu erfassen. Diese Kurve zeigt, daß der Druckablauf während eines Pulses nur noch annähernd wahrheitsgetreu abgebildet wird. Dieses ist bei der Trägheit der immerhin nicht unbeträchtlich bewegten Massen und der nicht sehr geeigneten Meßinstrumente nicht anders zu erwarten gewesen. Die Kurve zeigt aber auch, daß bei entsprechender Änderung der Apparatur auch solche schnelleren Druckschwankungen zur Darstellung gebracht werden können.

Um dies zu erreichen, ist in der Hauptsache zweierlei nötig: die Erhöhung der Eigenfrequenz des Druckabnehmers und die Verwendung eines Galvanometers mit relativ hoher Einstellgeschwindigkeit.

Auf diese wünschenswerte registriertechnische Vollkommenheit der Anordnung haben wir bei unseren Messungen bewußt verzichtet, weil hierfür kein Bedürfnis bestand.

Um Blutdruckkurven quantitativ zu erfassen, ist eine Eichung der Apparatur notwendig. Zur Durchführung einer Eichung ist vor allem die Kenntnis der Nullage erforderlich und davon ausgehend die Höhenlage der verschiedenen Druckwerte.

Wir haben uns zu diesem Zweck ein Gefäßmodell konstruiert.

Ein Stückchen Karotis von der Katze oder vom Kaninchen oder irgend ein anderes Gefäßstückchen, z. B. aus dem Kalbsmesenterium, wird an einem Ende zugebunden und das andere über eine Kanülenspitze geschoben und festgebunden. Eine Prüfung auf gute Abdichtung bzw. auf eine eventuell übersehene Unter-

bindung eines Seitenastes wird danach zweckmäßigerweise vorgenommen. Gefäßstumpf und Kanüle werden daraufhin mit Flüssigkeit gefüllt und durch ein T-Stück mit einer Pumpe (Gummigebläse) und einem Manometer verbunden. Der Gefäßstumpf kommt auf den Druckabnehmer in der vorgesehenen Rinne zu liegen. Senkrecht auf ihn wird der Stempel der Blattfeder gesetzt.

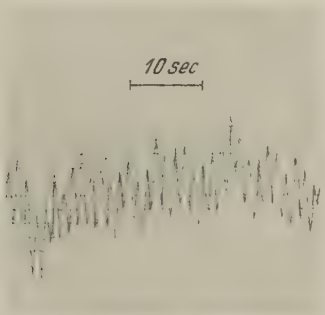


Abb. 4. Kaninchen I; 2,5 kg schwer. Morphin 10 mg je Kilogramm Tier. Präparation der rechten Karotis.

Abb. 5. Dekapitierte Katze.

Vor der Inbetriebnahme der Apparatur werden die einzelnen Teile, wie Beleuchtungsvorrichtung, Mikroskop, Photoaufsatz und Photoelement nochmals in ihrer optischen Achse zentriert und scharf eingestellt. Danach wird das Galvanometer angeschlossen und so einreguliert, daß der Lichtzeiger des Galvanometerspiegels auf der Skala des Kymographions einspielt.

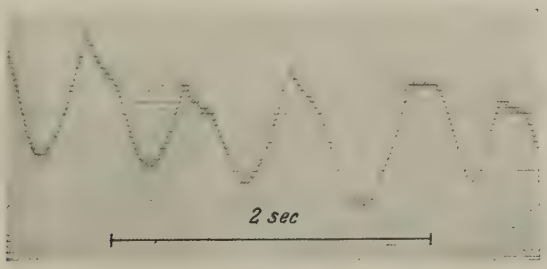


Abb. 6.

Die nötigen Druckwerte werden durch das Gummigebläse erzeugt und mit dem Manometer eingestellt. Durch die Stellschraube (*St*) am Objekttisch wird die Fahne so eingestellt, daß beim Druck Null eben kein Licht die Photozelle trifft. Das Galvanometer muß dann auch so einreguliert werden, daß der Lichtzeiger auf den Nullpunkt der Kymographionskala zu stehen kommt.

Nun werden durch Aufpumpen des Gefäßstumpfes verschiedene Druckstufen eingestellt und registriert. Es ist dabei zweckmäßig, das Licht der Mikroskopierlampe so zu verändern, daß bei dem zu erwartenden Maximaldruck der Lichtzeiger den Skalenendpunkt des Kymographions erreicht.

Bei unseren Eichversuchen mit Gefäßen von verschiedener Wandstärke ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede in der Höhe der Druckstufen.

In der Abb. 7 ist eine Originaleichung der Apparatur abgebildet, deren auf- und absteigende Druckstufen auf die oben geschilderte Weise gewonnen wurden. Die Drucke sind dabei in Zentimeter Wassersäule = g/cm² verzeichnet.

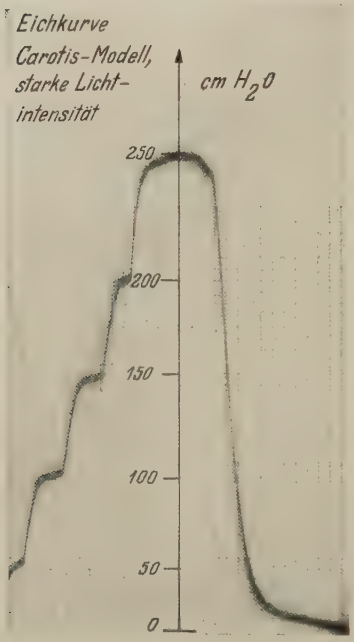


Abb. 7.

In Abb. 8 ist eine graphische Darstellung wiedergegeben, die die Beziehung zwischen Druck und Ausschlag veranschaulicht. Man sieht daraus, daß das Verhältnis des Druckes zum Ausschlag bei unserer Anordnung eine leicht gekrümmte Kurve ergibt, wobei der Ausschlag bei steigendem Druck leicht ansteigt. Durch entsprechende Änderung der oben beschriebenen Pappblende zu trapezförmigem Ausschnitt läßt sich mit Leichtigkeit erreichen, daß absolute Linearität zwischen Druck und Ausschlag geschaffen wird.

Durch stärkere oder schwächere Lichtintensität der Mikroskopierlampe kann die Ausschlagweite des Galvanometers variiert werden. Eine einmalig geeichte Apparatur bedarf keiner weiteren Nacheichung, wenn man zu Beginn eines Versuches die Lichtintensität und die Galvanometerempfindlichkeit auf die gewonnenen Eichwerte bringt.

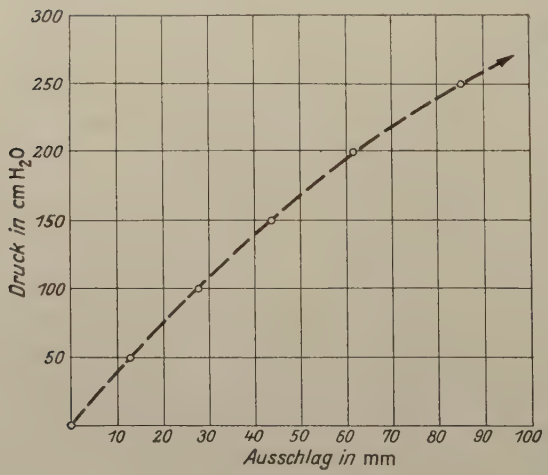


Abb. 8.

In Abb. 9, 10 und 11 ist die Einwirkung von Suprarenin und Acetylcholin auf den Blutdruck eines Kaninchens wiedergegeben. Ohne auf Einzelheiten dieser so wohl bekannten Versuchsergebnisse weiter einzugehen, soll nur damit gezeigt werden, wie solche Blutdruckänderungen von der Apparatur verzeichnet werden.

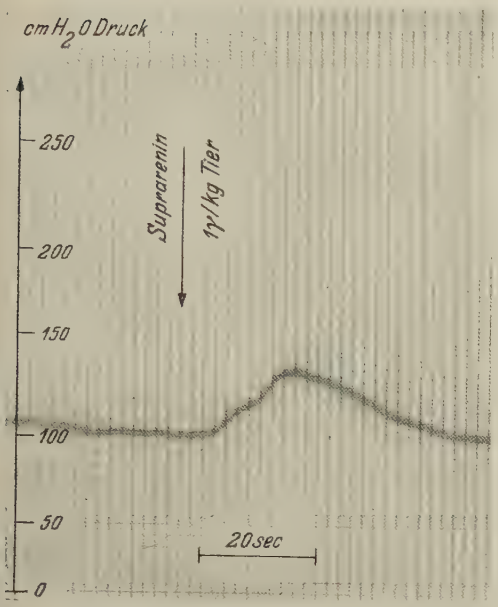


Abb. 9.

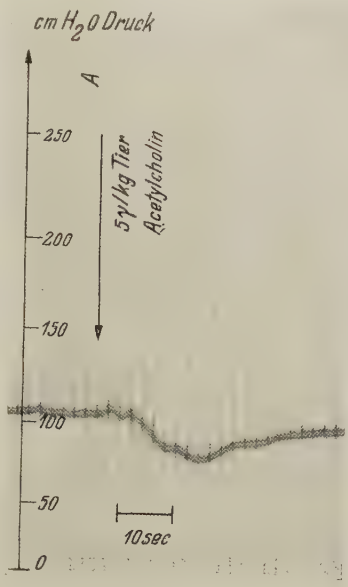


Abb. 10.

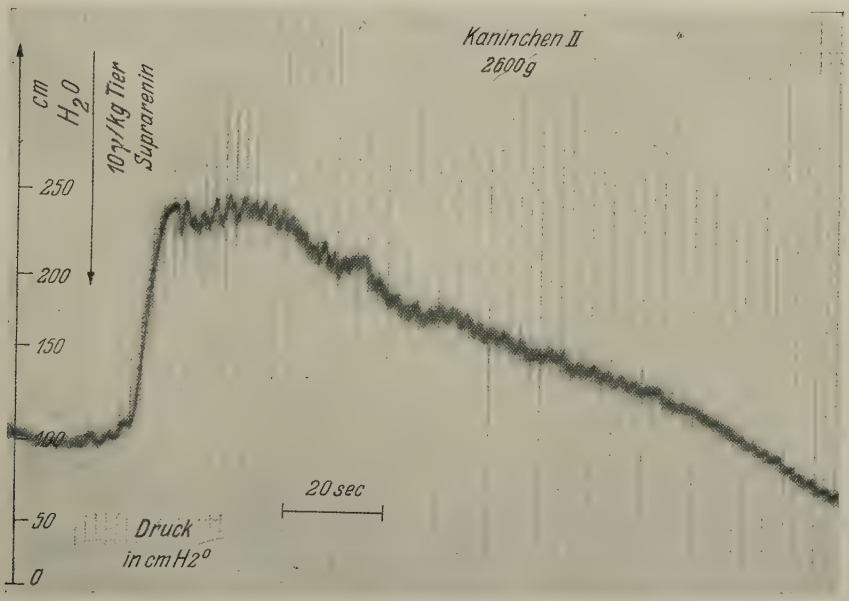


Abb. 11.

Abb. 9—11. Kaninchen II. 2,6 kg. Morphinnarkose (10 mg je Kilogramm Tier). Präparation der rechten Karotis in üblicher Weise. Abb. 9 zeigt die Wirkung einer Suprarenininjektion intravenös. Bei Abb. 10 Acetylcholinwirkung. Abb. 11 zeigt nochmalige Suprareninwirkung in höherer Dosis. Nach Versuchsbeendigung wird die Wunde geklammert. Wundheilung verläuft ohne Abszedierung und Fistelbildung.

Die abgebildeten Blutdruckkurven zeigen, daß mit der von uns beschriebenen Methode auf verhältnismäßig einfache und bequeme Art und Weise der Blutdruck in uneröffneten Gefäßen registriert werden kann. Die Ergebnisse übertreffen an Genauigkeit die Messungen mit den üblichen blutigen Methoden. Das Verfahren ist daher für die pharmakologischen Untersuchungen vollauf geeignet. Die Methode läßt sich weitgehend verfeinern und ist bei anderen Abmessungen der Federstärke sicherlich auch geeignet, Druckschwankungen in Venen fortlaufend zu registrieren.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur fortlaufenden Blutdruckmessung am uneröffneten Gefäß im Tierversuch beschrieben. Das Verfahren geht dabei von folgender Grundüberlegung aus: Die Gefäßwandung wird durch eine starke Feder von außen derart belastet, daß ihre Wandspannung im ganzen vorkommenden Druckbereich kaum bzw. gar nicht zur Geltung kommt. Die im Gefäß auftretenden Druckänderungen werden durch die Feder kompensiert und wirken verbiegend auf diese ein. Die geringen Grade der Verbiegung werden optisch durch ein Mikroskop vergrößert und als wechselnde Verschattungen auf ein Photoelement übertragen. Die hierbei entstehenden Stromschwankungen werden unter Anwendung eines Spiegelgalvanometers als Ausdruck von Blutdruckveränderungen auf einem Photokymographion registriert.

Literatur.

[1] Wagner, R.: Z. Biol. **100**, 186 (1940). — [2] Gomez, Mauricio et A. Langevin: C. r. Acad. Sci. Paris **199**, 890 (1934). — [3] Mie, H.: Klin. Wschr. **1941**, 860. — [4] Matthe, K.: Klin. Wschr. **1942**, 290. — [5] Hürthle: Pflügers Arch. **43**, 422 (1888).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Über die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin.

Von

F. Jung und H. Remmer.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Juli 1948.)

Nach unveröffentlichten Beobachtungen von R. Havemann und F. Jung bilden Nitrit und Hämiglobin (Methämoglobin) miteinander eine besondere Verbindung. Mit dieser Feststellung entsteht für die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin ein neuer Gesichtspunkt, von welchem her wir sie erneut untersucht haben. Dabei haben wir gefunden, daß sie sich in eine Anzahl einfacher und wohlverständlicher Teilreaktionen zerlegen läßt, die anschließend besprochen werden sollen.

I. Bildung von Hämiglobin durch Natriumnitrit.

Nach Rolf Meier[1] wandelt 1 Mol Nitrit in 15 Min. bei saurer Reaktion 1 Val Oxyhämoglobin vollständig, bei neutraler Reaktion nur zu $^1/_5$ in Hämiglobin um. Da bei der äquimolaren Umsetzung nur $^1/_4$ des an das Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs frei wird, formulierte er den Prozeß folgendermaßen:

$$4\,HbO_2 + 4\,HNO_2 + 2\,H_2O = 4\,HbOH + 4\,HNO_3 + O_2.$$

Etwas höhere Umsetzungsverhältnisse fanden Drabkin und Austin[2], nämlich 0,7 Mol Nitrit auf 1 Val Oxyhämoglobin, sowie Greenberg, Lester und Haggard[3], nach welchen 0,5 Mol Nitrit 1 Val Oxyhämoglobin zu Hämiglobin zu oxydieren vermögen. Da die Angaben der älteren Autoren aus methodischen Gründen nicht sehr verläßlich erscheinen, haben wir zunächst das Umsetzungsverhältnis in vitro erneut bestimmt. (Das Ergebnis von Greenberg und seinen Mitarbeitern wurde uns erst nach Abschluß dieser Arbeit bekannt.)

a) Bestimmung des Umsetzungsverhältnisses.

Eine $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ äquivalente Hämoglobinlösung wurde mit Natriumnitrit in steigenden Mengen versetzt. Die Lösung hatte ein p_H von 6,7, die Temperatur betrug 40° und die Umsetzungsdauer 12 Stunden. Hämo- und Hämiglobin wurden mit Hilfe des lichtelektrischen Kolorimeters von Havemann[6] nach der Zyanidmethode bestimmt. Die spontane Bildung von Hämiglobin wurde mit Hilfe einer Kontrolle berücksichtigt. In einem Versuch ergab sich:

	Zugesetztes Nitrit 10^{-6} mol.	Neugebildetes Hämiglobin 10^{-6} val.
1.	3,0	5,8
2.	10,0	19,6

Bei saurer Reaktion läßt sich die Umsetzung in erheblich kürzerer Zeit erzielen. Die von Greenberg und Mitarbeitern angegebene summarische Formulierung

$$NaNO_2 + 2\,Hb \cdot O_2 + H_2O = NaNO_3 + 2\,Hb \cdot OH + O_2$$

wird somit richtig sein. Ein Mol Nitrit bringt somit 2 Mol Hämoglobin zur Umsetzung.

Im Tierversuch fanden B. v. Issekutz[4] und Becker, Dordoni und Jung[5] niedrigere Umsetzungsverhältnisse. Der erstere gab für die Katze ein Äquivalenzverhältnis von 1:1 an, während die letzteren Autoren finden, daß die Ratte nur 0,5 Val Hämiglobin aus 1 Val Nitrit bildet.

Bei diesen Untersuchungen wurde die gebildete Hämiglobinmenge einfach aus der Konzentration des Hämiglobins im Augenblick des Vergiftungsmaximums und aus dem Blutvolumen ermittelt und auf die verabreichte Nitritdosis stöchiometrisch bezogen. Diese Berechnung ist nicht korrekt, da die Voraussetzung zugrunde liegt, daß die gebildete Menge an Hämiglobin nur eine Funktion der Giftdosis sei. Tatsächlich ist diese aber außerdem auch von der Geschwindigkeit abhängig, mit der laufend das neugebildete Hämiglobin zu Hämoglobin reduziert wird. Auf die Bedeutung der Reduktionsvorgänge für den Ablauf der Nitritvergiftung wird in dieser Arbeit an einer anderen Stelle noch näher eingegangen. — Die wirklich umgesetzte Menge an Hämiglobin ist deshalb höher anzusetzen. Denn wir müssen aus der Reduktion des Hämiglobins im Blute annehmen, daß nach 1 Stunde, wenn etwa die maximale Konzentration im Blute erreicht wird, bereits ein Teil des Hämiglobins reduziert ist. Dabei ist die Reduktionsgeschwindigkeit bei der Katze, wie Jung[7] zeigte, weitgehend abhängig von der Hämiglobinkonzentration im Blute. Aber auch nach Überschreiten der maximalen Konzentration ist Nitrit noch wirksam und bildet weiter geringe Mengen an Hämiglobin. Denn die Geschwindigkeit, mit der die Konzentration nach der ersten Stunde abnimmt, ist geringer, als aus der Rückbildungsgeschwindigkeit des unbeeinflußten Hämiglobin zu erwarten wäre.

Wie aus dem zeitlichen Ablauf der Blutkonzentration und der in anderen Versuchen bestimmten Rückbildungsgeschwindigkeit der betreffenden Tierart die insgesamt gebildete Hämiglobinmenge zu berechnen ist, wurde von Jung[8] ausführlich dargelegt und an den Beispielen Phenylhydroxylamin, Nitrobenzol und Dinitrophenylhydroxylamin erläutert. Die Daten, die v. Issekutz[4] über die Hämiglobinbildung durch Nitrit angegeben hat, lassen eine genaue Berechnung nicht zu. Bei einem Versuch, diese wenigen Angaben und die Rückbildungsgeschwindigkeit des Hämiglobins im Blute der Katzen[7] nach

dieser Methode ungefähr auszuwerten, kommt man zu einem Umsetzungsverhältnis von Nitrit zu Hämiglobin, welches 1:1 weit übertrifft und bei etwa 1:1,5 liegt.

Auch bei der Anwendung einer Abschätzung, welche auf eine Berechnungsmöglichkeit zurückgeht, die von KIESE[9] angegeben wurde, wird ein höheres Umsetzungsverhältnis als 1:1 erhalten.

Mit der Feststellung eines Umsetzungsverhältnisses in den Tierversuchen von v. ISSEKUTZ, welches 1 übersteigt, entfällt somit der oben erwähnte Widerspruch und man kann annehmen, daß die Umsetzung des Nitrits mit dem Hämoglobin auch in vivo im stöchiometrischen Verhältnis 1:2 stattfindet, um so mehr als das Nitrit im Organismus keineswegs nur mit dem Blutfarbstoff reagieren dürfte. Für die Versuche von BECKER u. a. an Ratten läßt sich eine ähnliche Beweisführung erbringen.

b) Zeitlicher Ablauf der Umsetzung in vitro.

Von DRABKIN und AUSTIN[2] wurde festgestellt, daß niedere Nitritkonzentrationen (Mol-Verhältnis Nitrit zu Hämoglobin 0,24—0,84) sich innerhalb 2 Stunden bei Zimmertemperatur nicht mit dem Hämoglobin umsetzen, daß aber jede zusätzliche Gabe von 0,5—0,7 Mol-Nitrit zu einer sofortigen Oxydation der äquivalenten Menge Hämoglobin führt. Dieses eigentümliche Ergebnis weist auf Besonderheiten des Reaktionsablaufes hin, auf welche auch die Versuche ROLF MEIERS schließen lassen. Wir haben daher eine Anzahl reaktionskinetischer Versuche durchgeführt.

Die Lichtextinktion der Reaktionsgemische wurde im roten Spektralbereich (Filter OG 3 und RG 2) verfolgt. Durch spektrometrische Auswertung wurde sichergestellt, daß außer Hb(3) keine anderen Farbstoffe bei der Umsetzung auftraten. Durch eine Eichung mit Gemischen von Hb(3) und Hb(2)-Lösungen bekannten Gehaltes war es möglich, aus der Lichtschwächung den jeweiligen Hb(3)-Gehalt des Reaktionsansatzes festzustellen. Die Versuchstemperatur betrug 26° und wurde durch Verwendung einer gemantelten Küvette sichergestellt. Durch Zugabe von Phosphatpuffer nach SÖRENSEN wurde die Wasserstoffionenkonzentration eingestellt.

Im einzelnen ergab sich folgendes:

1. Die Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin setzt langsam ein; die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt im Laufe des Versuches zu, erreicht ein Maximum und fällt dann wieder ab. Es handelt sich somit um eine autokatalytische Reaktion.

2. Das Reaktionsprodukt Hämiglobin kann nicht in einer ähnlichen Weise wie bei der Umsetzung zwischen Kaliumchlorat und Hämoglobin die Ursache des autokatalytischen Ablaufs sein[10]. Abb. 1 zeigt nämlich, daß bei Verwendung von Ausgangslösungen, in welchen ein Drittel oder zwei Drittel des Hämoglobins bereits in der oxydierten

Stufe vorliegt, die Reaktion ebenfalls eine wenn auch verkürzte Anlaufszeit besitzt.

3. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von der vorgelegten Hämoglobinkonzentration nur wenig abhängig. Eine genauere Feststellung war kaum möglich, doch führte z. B. in einem Versuch Steigerung der Hämoglobinkonzentration auf das 10fache lediglich zu einer Verkürzung der Anlaufszeit auf ungefähr die Hälfte.

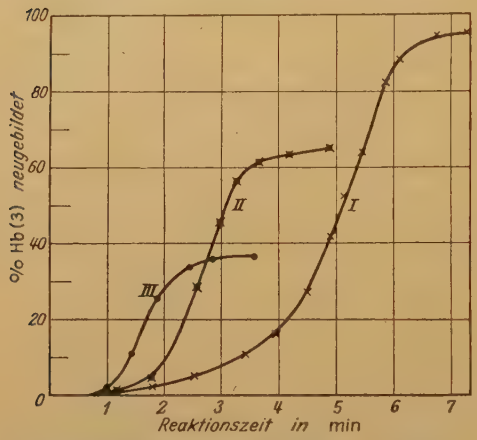


Abb. 1. Bedeutung des Hb(3) für den Reaktionsablauf zwischen Hämoglobin und Natriumnitrit. — Gesamthämoglobinkonzentration: 5,3 10^{-5} mol, Nitritkonzentration: 4,3 10^{-4} mol, p_H = 6,7, Temperatur: 25°. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Neugebildetes Hb(3) in Prozent des Gesamthämoglobins. Kurve I: Etwa 0% des Hämoglobins als Hb(3) zu Versuchsbeginn. Kurve II: 31% des Hämoglobins als Hb(3) zu Versuchsbeginn. Kurve III: 62,5% des Hämoglobins als Hb(3) zu Versuchsbeginn.

4. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt sehr stark mit der Wasserstoffionenkonzentration zu (Abb. 2).

5. Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigte sich sehr stark von der Nitritkonzentration abhängig. Auf eine Abbildung wird verzichtet, da das Bild völlig dem der Abhängigkeit von der $[H^+]$ entspricht.

Das parallele Verhalten der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit sowohl von der H-Ionen- und der Nitritkonzentration könnte am einfachsten damit erklärt werden, daß der unmittelbare Reaktionspartner des Hämoglobins nicht das NO_2-Ion, sondern die undissoziierte salpetrige Säure ist. (Ihre Dissoziationskonstante beträgt bei 25° $10^{-3,3}$.) Weitergehende Schlüsse lassen sich aus diesen Ergebnissen nicht erzielen. Es sei daran erinnert, daß selbst bei der einfachen bimolekularen Umsetzung des Ferrizyankaliums mit Hämoglobin die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der H-Ionenkonzentration kompliziert ist.

II. Die Reaktion von Hämiglobin mit Natriumnitrit.

a) Die Bildung einer Verbindung zwischen Hämiglobin und Nitrit.

Bei der Umsetzung von Blut mit überschüssigem Natriumnitrit läßt sich beobachten, daß die typische Absorptionsbande des Hämiglobin im Roten wieder schwächer wird.

Haldane[11], der diese Erscheinung im Blut nitritvergifteter Mäuse erstmals gesehen hat, führte sie auf eine Reduktion des Hämiglobins

zu Hämoglobin durch das überschüssige Nitrit zurück. Der rötliche Farbton, der dabei auftritt, soll dadurch entstehen, daß freiwerdendes NO sich dann mit dem Hämoglobin zu Stickoxydhämoglobin zusammen lagere. In derselben Weise wurde von HAUROWITZ[12] die auch in vitro eindrucksvolle Erscheinung gedeutet. ROLF MEIER und DRABKIN und AUSTIN schließen sich dieser wohl vielfach anerkannten Erklärung an. Nur HARTRIDGE[13] vertritt die Ansicht, daß das Hämoglobin mit dem Nitrit eine besondere Verbindung bildet.

Unsere eigenen Versuche gingen von der Beobachtung aus, daß Blutkörperchen bei Zusatz von Nitrit im Überschuß rot gefärbt sind,

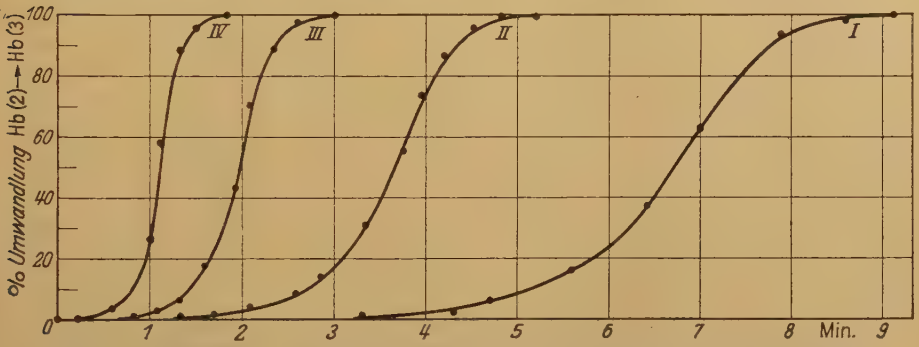


Abb. 2. Abhängigkeit des Reaktionsablaufs von der Wasserstoffionenkonzentration. Gesamthämoglobinkonzentration: 10^{-5} mol, Nitritkonzentration: 4,3 10^{-4} mol, Temperatur: 25°. pH: Kurve I 7,0, Kurve II 6,8, Kurve III 6,6 und Kurve IV 6,4. Abszisse und Ordinate wie Abb. 1.

aber wenn sie mehrmals anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden, wieder die braune Farbe annehmen und reines Hämiglobin enthalten. Derselbe Farbumschlag vom Rot in Braun läßt sich beobachten, wenn Hämoglobin- oder Hämiglobinlösungen mit einem Überschuß von Natriumnitrit versetzt und danach dialysiert werden. Die rote Hämiglobin-Nitritlösung besitzt ein charakteristisches Absorptionsspektrum, das man stets in gleicher Weise erhält und das sich deutlich von dem des Hämoglobins und des Hämiglobins unterscheidet (vgl. Abb. 3). Die Absorptionsmaxima liegen bei 625 und 538 mμ gegen 630 und 502 mμ beim Hämiglobin.

Bei der Betrachtung dieser Lichtabsorptionskurve könnte man vermuten, daß die Lösung ein Gemisch von Hämiglobin und Stickoxydhämoglobin enthalte. Nimmt man an, daß tatsächlich ein solches Gemisch vorliege, und daß das Maximum bei 625 mμ in Wirklichkeit das Hämiglobinmaximum bei 630 mμ darstelle, so könnte man die Lichtabsorptionskurve der zweiten Verbindung berechnen, welche dem Hämoglobin beigemischt wäre. Aus dem Verhältnis der Lichtabsorption der Hämiglobin-Nitritlösung zu der einer reinen Hb(3)-Lösung gleicher

Hb-Konzentration im roten Spektralbereich wird zunächst berechnet, welcher Bruchteil von dem Gemisch als hypothetisches Hämiglobin vorhanden sein könnte. Die ermittelten Quotienten sind nicht gleich, sondern nehmen zwischen 650 mμ und 630 mμ von 0,55—0,75 zu. Die Verschiedenheit dieser Quotienten läßt die aufgestellte Hypothese

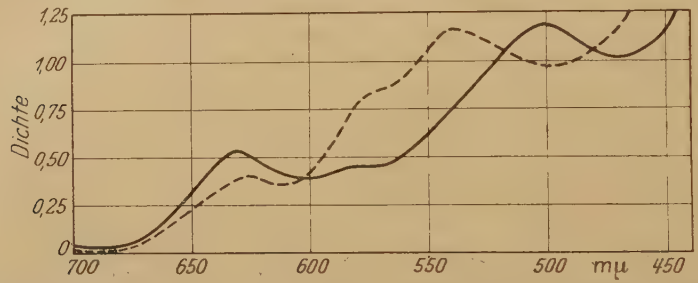


Abb. 3. Hämiglobinnitrit. pH 6,8. Abszisse: Wellenlänge in mμ. Ordinate: Extinktion (willkürliche Einheit). ——— Hb(3) 0,44%. - - - - - ebenso + $NaNo_2$ im Überschuß.

bereits zweifelhaft erscheinen. Nimmt man auf Grund dieser Berechnung eine Beimischung von etwa 70% Hämiglobin an, so lassen sich die Extinktionswerte dieses Anteils auch im übrigen Spektralbereich ermitteln und von denen der beobachteten Kurve abziehen. Es ist

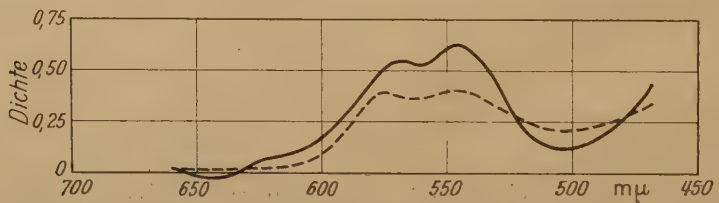


Abb. 4. Konzentration und Maßstab wie Abb. 4. Vergleiche sonst Text. - - - - Hb(2) — NO 0,13%. ——— Differenzenkurve: [Hb(3) + Nitrit] — [Fiktives Hb(3)].

nicht notwendig, die Berechnung im einzelnen wiederzugeben. Das ermittelte Differenzspektrum ist auf Abb. 4 zu sehen und einer Stickoxydhämoglobinkurve von der entsprechenden Restkonzentration (30% des Gesamt-Hb) gegenübergestellt. Der Versuch und die Berechnung wurden mehrfach mit übereinstimmendem Ergenis wiederholt. Dieses Ergebnis macht die alte Ansicht von Haldane unwahrscheinlich. Es ist nicht anzunehmen, daß technische Mängel des verwandten Spektralphotometers, etwa geringes Auflösungsvermögen usw., das Ergebnis grundsätzlich beeinflussen könnten.

Zur weiteren Differenzierung gegenüber der roten Hb(3)-Nitritlösung wurde Stickoxydhämoglobin-Lösung in größerem Umfange hergestellt. Dabei wurde auf Sauerstofffreiheit geachtet und als Ausgangsmaterial Kaninchenblut verwandt, das besonders wenig Hb(3)

enthält. Das Stickoxydhämoglobin wurde außer durch sein charakteristisches Absorptionsspektrum durch folgende Reaktionen abgegrenzt:

1. Stickoxydhämoglobin ist sehr stabil, es ändert sich an der Luft nicht.

2. Zugabe von Natriumhyposulfit bewirkt keinen Farbwechsel.

3. Zugabe von Kaliumferryzyanid führt sehr langsam, im Verlauf von 24 Stunden, zur Hämiglobinbildung.

4. Zugabe von KCN ist ohne Einfluß auf die Lichtabsorption.

5. Dialyse von NO-haltigen Erythrozyten, d. h. Waschen in NO-freier Kochsalzlösung, führt zu keinem Übergang in Hämiglobin.

6. Zugabe von Natriumnitrit in großem Überschuß läßt langsam das oben besprochene Mischspektrum entstehen. Das Ende der Umsetzung ist nach etwa 24 Stunden erreicht.

Demgegenüber zeigt das Reaktionsgemisch Hämiglobin-Nitrit folgende Eigenschaften:

1. Namentlich bei saurer Reaktion ändert die Lösung ihre Farbe und es bildet sich ein Verdoglobin.

2. Zugabe von Natriumhyposulfit führt schlagartig zur Bildung von reinem Hb(2)-NO.

3. Zugabe von Kaliumferrizyanid bewirkt auch nach längerer Zeit keine Umsetzung.

4. Zugabe von KCN läßt Hb(3)-CN entstehen. Die Identität wurde spektrometrisch eindeutig festgestellt. Bei Dialyse verschwindet die rote Farbe und in kurzer Zeit erscheint ein reines Hb(3). Damit ist wohl der Beweis erbracht, daß bei der Umsetzung von Hämoglobin oder Hämiglobin mit überschüssigem Nitrit kein Gemisch von Hb(3) und Hb(2)-NO vorliegt. Es ist anzunehmen, daß alles Hämoglobin als Hämiglobin vorhanden ist, daß aber dieses Hämiglobin mit dem Nitrit eine Verbindung eingegangen ist, die den zahlreichen anderen salzartigen Hämiglobinverbindungen entspricht:

$$Hb(3)OH + NaNO_2 = NaOH + Hb(3)NO_2$$

Die eigene Farbe dieses Salzes ist wohl so zu verstehen, daß sie dem nicht dissoziierten Molekül zukommt, da andere in Sonderheit starke Säuren, wie Salzsäure oder Chlorsäure, keine besondere Farbe bedingen; die braune Farbe des „sauren Hämiglobins" ist also wohl die Farbe des Hämiglobinions.

b) Eigenschaften des Hämiglobinnitrits.

In einigen Vorversuchen wurde mit Hilfe des Zeiß-Ikon-Spektralphotometers die Abhängigkeit der Bildung des Hämiglobinnitrits von der Nitritkonzentration ermittelt. Die dabei erhaltenen Kurvenscharen

(Abb. 5) waren ein weiterer Hinweis, daß zwischen Hämiglobin und Nitrit eine Verbindung entsteht, deren Bildung streng nach dem Massenwirkungsgesetz vor sich geht. Wir versuchten daher, die Dissoziationskonstante genauer zu bestimmen. Die Messungen wurden mit dem photoelektrischen Kolorimeter nach Havemann unter Verwendung der grünen Hg-Linien, zum Teil im Glühlicht unter Ausfilterung geeigneter Spektralbereiche, durchgeführt.

Dabei ergaben sich zunächst unerwartete Schwierigkeiten. Die Reaktion ist sehr temperaturabhängig, so daß in einer ummantelten und temperierten Küvette gearbeitet werden mußte. Aber trotz aller Vorsichtsmaßnahmen war ein stetes

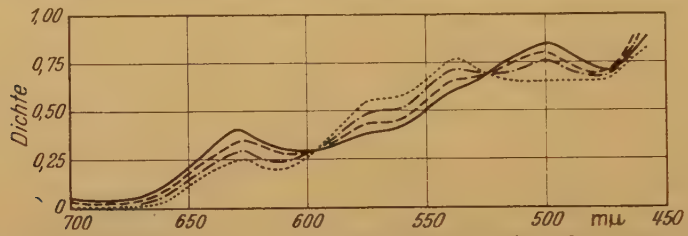


Abb. 5. Hämiglobinnitrit. pH 6,8. Hb(3) 0,32%, Zusatz wechselnder Mengen $NaNO_2$. Maßstab wie Abb. 4. —— Molverhältnis $\frac{NaNO_2}{Hb(3)} = 1$. - - - - - Molverhältnis $\frac{NaNO_2}{Hb(3)} = 5$. -·-·-·- Molverhältnis $\frac{NaNO_2}{Hb(3)} = 10$. ····· Molverhältnis $\frac{NaNO_2}{Hb(3)} = 50$.

Wandern der Meßwerte nicht zu umgehen. Wurde sehr schnell und gleichmäßig gearbeitet, so konnten regelmäßige Massenwirkungskurven erhalten werden, doch wechselte das pK von Reaktionsansatz zu Reaktionsansatz völlig unsystematisch. Allerdings lagen alle Werte zwischen 3 und 2,5. Das Wandern der Meßwerte hörte nun überraschenderweise völlig auf, als auf das Arbeiten mit reinen Hämiglobinlösungen verzichtet und Kaliumferrizyanid im Überschuß zugesetzt wurde. Wir können uns diesen Effekt nicht befriedigend erklären, möchten aber annehmen, daß dadurch irgendwelche Nebenreaktionen des Nitrits am Hämoglobin (etwa die Verdoglobinbildung) verzögert werden.

In einer Reihe von Versuchen ergab sich bei einer Temperatur von 20° und einem p_H von 6,7 die Dissoziationskonstante zu $10^{-2,6}$.

III. Weitere Versuche in vitro.

a) Die Umsetzung von Hämiglobin mit Stickoxyd.

In einem Reaktionsgefäß wurde unter Sauerstoffausschluß NO zur Einwirkung auf Hämiglobin gebracht. Dabei entstand eine bläulichrote Lösung, die ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit Maxima bei 567 mμ und 537 mμ zeigt (Abb. 6). Die Verbindung war aber nicht stabil, sondern ging langsam in Gegenwart des NO in Hb(2)NO über. Wurde das Stickoxyd durch Evakuieren entfernt, so blieb ein Gemisch zurück, welches überwiegend aus Hb(2)NO und einem kleinen Rest (10—20%) Hb(3) bestand. Natriumhyposulfit reduzierte dagegen sofort die Hb(3)-NO-Lösung zu Hb(2). Bei Zusatz von KCN zu

Hb(3)NO konnte von uns im Gegensatz zu KEILIN und HARTREE[14] keine Bildung von Hb(3)CN beobachtet werden. Ihre Werte für die Maxima betragen 568 mμ und 531 mμ und weichen von unseren ab. (Der von uns zur Messung verwandte Spektrodensograph von Zeiß-Ikon wurde für diese Versuche mittels einiger Metalldampflampen noch besonders geeicht.) Durch die vorliegenden Versuche ist das Bestehen einer Verbindung von Hb(3)-NO noch nicht sicher bewiesen.

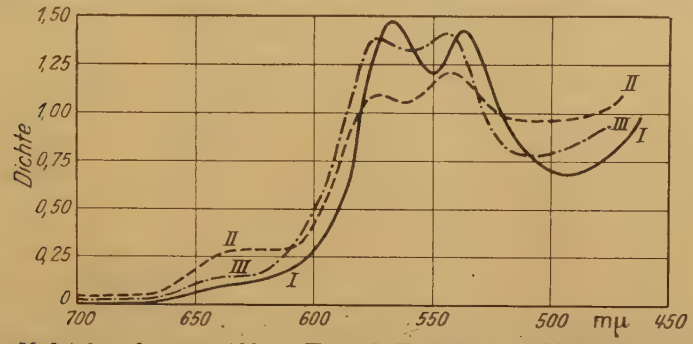


Abb. 6. Maßstab und p_H wie Abb. 4. Kurve I: Hb(3) 0,4% + NO. Kurve II: ebenso, anschließend 2 Stunden evakuiert. Kurve III: ebenso, nach Evakuieren + $Na_2S_2O_4$.

b) Die Umsetzung von Hämoglobin mit Natriumnitrit bei Sauerstoffausschluß.

ROLF MEIER[1] hat bereits diese Reaktion qualitativ verfolgt und vermutet, daß sich dabei ein Gemisch von Hb(3) und Hb(2)-NO bilde. Er formulierte folgendermaßen:

$$2Hb^{II} + HNO_2 \rightarrow Hb^{III}OH + Hb^{II}\text{-}NO$$

Genaue quantitative Messungen liegen von M. BROOKS[15] vor. Sie stellte spektroskopisch und gasanalytisch fest, daß ein Mol Natriumnitrit zwei Val Hb in ein Val Hb(3) und in ein Val Hb(2)-NO umwandelt. Für die Beurteilung der Vorgänge in vivo ist diese Umsetzung auch von Bedeutung, da im zirkulierenden Blute und vor allem auch postmortal mitunter sehr wenig Sauerstoff zugegen sein kann. Wir erweiterten die Versuche von BROOKS insofern, als wir die Umsetzung auch in Gegenwart von Nitrit im Überschuß überprüften.

90 cm³ einer 0,4%igen Hb-Lösung wurden durch Evakuieren des Sauerstoffs reduziert und in Stickstoffatmosphäre wurden 10 cm³ 0,5 Mol Natriumnitritlösung hinzugefügt. Das p_H betrug 6,8. Das dabei erhaltene Spektrum (Abb. 7, Kurve a) unterschied sich deutlich sowohl von einem Mischspektrum aus Hb(3) und Hb(2)NO, als auch von dem des Hb(3)-Nitrits. Wurde von der Absorptionskurve des Reaktionsgemisches (Abb. 7, Kurve a), welches 0,36% Gesamt-Hb enthielt, die des Hb(3)-Nitrit (0,18% Hb) (Abb. 7, Kurve c) subtrahiert, so

ergab sich Kurve b. Sie entspricht genau einem Hb(2)-NO-Spektrum von 0,18% Hb-NO. Nach Verdoppeln der Ordinatenwerte erhält man die Kurve des Hb(2)-NO, welche völlig derjenigen entspricht, die nach Reduktion des Versuchsgemisches mit Natriumhyposulfit bestimmt wurde. Um sicher zu stellen, daß das Reaktionsgemisch tatsächlich zu gleichen Teilen aus Hb(3)-Nitrit und Hb(2)-NO besteht, wurden Hb(3) und Hb(2)-NO-Lösungen im Verhältnis von 3:1, 1:1, und 1:3 gemischt, wobei die Gesamt-Hb-Konzentration gleich derjenigen im Versuchsansatz gewählt wurde. Natriumnitrit im großen Überschuß setzte

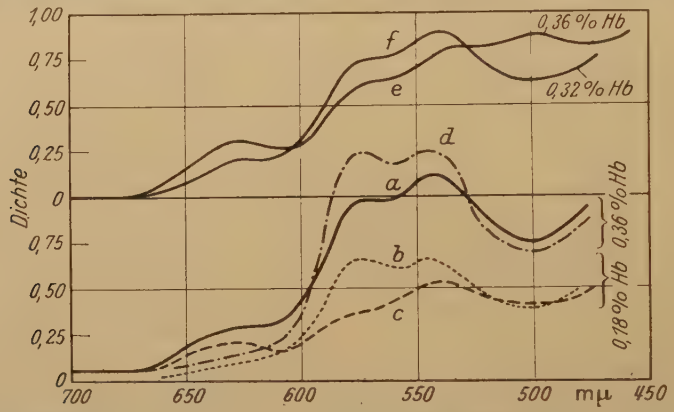


Abb. 7. Maßstab und pH wie Abb. 4. Kurve a: Reduziertes Hb(2) (0,36%) + $NaNO_2$ (Überschuß). Kurve d: ebenso, nach Zugabe von $Na_2S_2O_4$ [Hb(2) — NO-Bildung]. Kurve b und c: vgl. Text. Je 0,18% Gesamthämoglobin. Kurve e: Vergleichskurve: Hb(3) + Hb(2) — NO je 0,18%, insgesamt also 0,36% Hb. Kurve f: Vergleichskurve: Hb(3) — NO_2 + H(2) — NO je 0,16%, insgesamt also 0,32% Hb.

sich nur mit dem Hb(3) um und führte die Vergleichslösungen in Gemische von Hb(3)-Nitrit und Hb(2)-NO über. Der Verlauf der Lichtabsorptionskurve des Gemisches aus gleichen Teilen Hb(3)-Nitrit und Hb(2)-NO stimmt mit der des Versuchsansatzes überein. Schließlich wurde noch festgestellt, daß Zugabe von KCN zum Versuchsansatz zur Bildung eines Mischspektrums von Hb(3)-CN und Hb(2)-NO führt. Da ferner das Spektrum des Versuchsansatzes nicht haltbar ist, sondern, wenn auch langsam, innerhalb 24 Stunden vollständig in die Lichtabsorptionskurve des reinen Hb(3)-Nitrit übergeht, scheint uns der schlüssige Beweis erbracht, daß die Umsetzung von Hb mit Natriumnitrit bei Sauerstoffabwesenheit auch bei einem Überschuß von Nitrit in der von R. Meier und Brooks beschriebenen Weise verläuft. Nur führt der Nitritüberschuß zusätzlich zum Übergang des Hämiglobins in Hämiglobinnitrit.

$$1.\ 2Hb^{II} + HNO_2 \rightarrow Hb^{II}NO + Hb^{III}OH$$
$$2.\ Hb^{III}OH + HNO_2 \rightarrow Hb^{III}NO_2 + H_2O$$

IV. Umsetzung des Nitrits im lebenden Blute.

a) Die Reaktion von Nitrit mit dem Hämoglobin frisch isolierter Blutkörperchen.

Von Warburg, Kubowitz und Christian[16] wurde gezeigt, daß in den roten Blutkörperchen Reduktionsvorgänge laufen, durch welche Hämiglobin in Hämoglobin zurückverwandelt wird. Dieser Prozeß, der in der letzten Zeit von verschiedener Seite eingehend untersucht worden ist (Kiese[17, 18], Gutman und Mitarbeiter[19]) wird sich auch bei Einwirkung von Nitrit auf frisch entnommene Blutkörperchen bemerkbar machen. Wir haben daher die Blutfarbstoffänderungen untersucht, welche durch Nitrit in den verschiedensten Konzentrationen an lebenden im Serum bei 40° suspendierten Erythrozyten herbeigeführt werden. Zu den Versuchen wurde menschliches frisch entnommenes Blut verwandt. Jeder Versuchsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Blut ($8{,}2 \times 10^{-3}$ mol Hb)	1 cm³
Phosphatpuffer (Sörensen)	1 cm³
Natriumnitrit	1 cm³

Es wurden Pufferlösungen vom p_H 6,0; 6,5; 7,0 und 7,5 verwandt. Die Nitritkonzentration wurde so variiert, daß folgende Verhältnisse von Mol Nitrit zu Val Hämoglobin entstanden:

1:10, 1:3,7, 1:1, 3,7:1, 10:1, 37:1, 50:1, 100:1.

Zur Bestimmung der Absorptionskurven wurden je 0,5—1 cm³ entnommen, mit Wasser hämolysiert, scharf zentrifugiert und dann in die Meßküvette eingefüllt. Proben wurden entnommen: sofort, nach 2, 24, 36, 48 Stunden. Spektrophotometrisch wurden die Lösungen grob quantitativ analysiert.

Durch Oxydation mit Ferrizyanid wurde der Anteil von Sauerstoffhämoglobin ermittelt. Kurven von Vergleichsmischungen dienten zur weiteren Differenzierung. Nach Zusatz von KCN konnte aus dem Verlauf der Kurven auf den Anteil von Hb(2)-NO geschlossen werden. Wie im einzelnen vorgegangen wurde, zeigt als Beispiel Abb. 8.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 (S. 471) zusammengestellt. Aus ihr läßt sich entnehmen:

Hämiglobin wird nach den Gesetzmäßigkeiten gebildet, welche im ersten Abschnitt entwickelt wurden. Bei saurer Reaktion geht die Umsetzung erheblich schneller vor sich als bei alkalischer. Eine beinahe quantitative Umsetzung wurde bei dem Verhältnis von Nitrit zu Hb wie 1:2 in saurer Reaktion bereits nach 2 Stunden beobachtet. Bei Verwendung eines großen Nitritüberschusses liegt ein Teil oder auch das gesamte Hämiglobin in der Form des Nitrithämiglobins vor. In den ersten 24 Stunden setzen nun Reduktionsvorgänge ein, durch welche das Hämiglobin teilweise wieder reduziert wird, wobei sich Stickoxydhämoglobin bildet. Bemerkenswerterweise tritt das letztere

auch dann auf, wenn zunächst kein Hämiglobinnitrit nachgewiesen wurde. Zu seiner Bildung genügt also eine erheblich geringere Nitritmenge, ja, wie in einem Fall beobachtet werden konnte, bereits Nitritmengen, welche dem Hämoglobin nicht mehr äquivalent sind

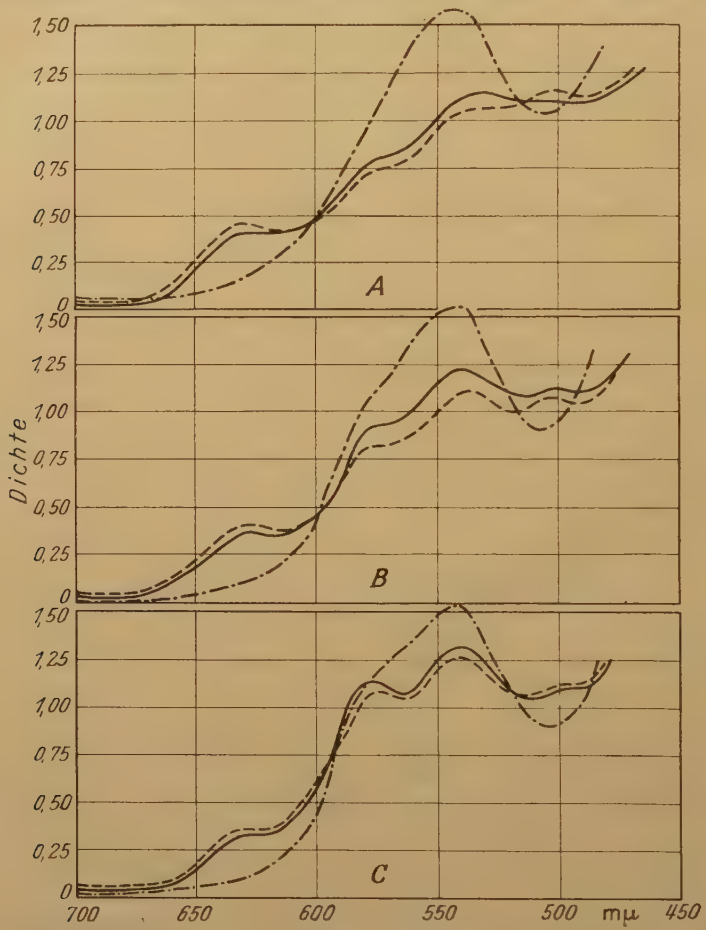


Abb. 8. Maßstab wie Abb. 4. $p_H = 6{,}5$. Gesamthämoglobin 0,46%. ——— Blut + $NaNO_2$, Molverhältnis $\frac{NaNO_2}{Hb} = 10$. - - - - - ebenso nach Zugabe von $K_3Fe(CN)_6$. - · - · - · ebenso nach weiterem Zusatz von KCN. *A* Messung sofort nach $NaNO_2$-Zugabe. *B* Messung 24 Stunden nach $NaNO_2$-Zugabe. *C* Mesung 48 Stunden nach $NaNO_2$-Zugabe.

(Molverhältnis 1:3,7). Bei einem größeren Überschuß von Nitrit bekommt man nach 24 Stunden oder später Gemische von Hämiglobin, Hämiglobinnitrit und Stickoxydhämoglobin oder auch nur Hämiglobinnitrit und Stickoxydhämoglobin. Bei einem Verhältnis von 50:1 und 100:1 wurde bei saurer Reaktion im Verlaufe einiger Tage die Bildung

Tabelle 1.

$NaNO_2$ / Hb(2)	Sofort nach Zusatz		2 Stunden nach Zusatz		Nach 24 Stunden		Nach 2 Tagen		Nach 3 Tagen	
	pH 6	pH 7,5	pH 6	pH 7,5	pH 6	pH 7,5	pH 6	pH 7,5	pH 6	pH 7,5
1:10	O_2Hb ++++	O_2Hb ++++			O_2Hb ++++	O_2Hb ++++	O_2Hb ++++ Hb(3) +	O_2Hb ++++ Hb(3) (+)		
1:3,7			O_2Hb ++ Hb(3) ++	O_2Hb +++ Hb(3) +	O_2Hb + Hb(3) +++	O_2Hb ++ Hb(3) ++	O_2Hb ++ Hb(3) + HbNO +	O_2Hb (+) Hb(3) +++		
1:1	O_2Hb ++ Hb(3) ++	O_2Hb ++++ Hb(3) (+)			O_2Hb (+) Hb(3) ++ HbNO +	O_2Hb (+) Hb(3) ++ HbNO +	O_2Hb + Hb(3) + HbNO ++	O_2Hb (+) Hb(3) + HbNO ++	O_2Hb ++ Hb(3) + HbNO +	Hb(3) + HbNO +++
3,7:1			Hb(3) ++++	Hb(3) ++++	Hb(3) +++ HbNO +	Hb(3) ++ HbNO ++	Hb(3) ++ HbNO ++	Hb(3) + HbNO +++		
10:1	Hb(3) + HbNt +++	Hb(3) + HbNt +++			Hb(3) + HbNt ++ HbNO +	Hb(3) + HbNt + HbNO ++	Hb(3) + HbNt + HbNO +	Hb(3) + HbNt + HbNO ++	Hb(3) + HbNt (+) HbNO +++	Hb(3) + HbNt + HbNO ++
50:1	HbNt ++++	HbNt ++++			HbNt ++ HbNO ++	HbNt ++ HbNO ++			HbNt + + VdGl + +	HbNt ++ HbNO ++

Anmerkung: HbNt = Hb(3)-Nitrit, VdGl = Verdoglobinverbindung.

eines Verdoglobins beobachtet. Die Grünfärbung war übrigens schon R. Meier[1] aufgefallen. Unter dem Einfluß von Nitrit und Wasserstoffperoxyd hatte auch Havemann[20] die Bildung eines Verdoglobins beobachtet und näher untersucht. Das unter unseren Versuchsbedingungen gebildete Verdoglobin besitzt sehr charakteristische Eigenschaften, die inzwischen eingehend von Kiese[21] untersucht und dargestellt worden sind.

b) Verhalten des Nitrits im Tierversuch.

Da die Bildung von Hämiglobinnitrit einen 50—100fachen Überschuß von Natriumnitrit, d. h. Bedingungen voraussetzt, unter welchen das gesamte Hämoglobin in kurzer Zeit in Hämiglobin und Hämiglobinnitrit übergeht, ist seine Bildung in vivo praktisch nicht oder nur

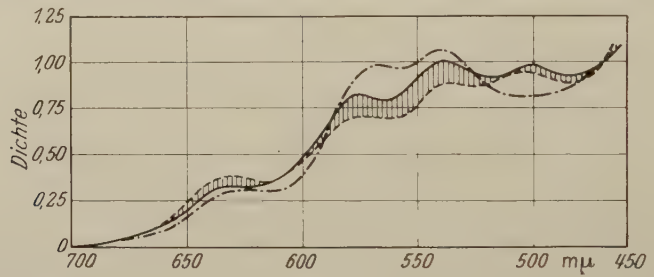


Abb. 9. Maßstab wie Abb. 4. Hämolysiertes Blut einer mit 0,5 g $NaNO_2$ vergifteten Ratte. ——— unmittelbar postmortal. - - - - - ebenso nach Zugabe von $K_3Fe(CN)_6$. - · - · - · Entnahme 6 Stunden postmortal, $K_3Fe(CN)_6$ bleibt nun ohne Einfluß.

kurz vor dem Eintritt des Todes möglich. Auch eine postmortale Bildung ist unwahrscheinlich. Trotzdem unternahmen wir einige Tierversuche, bei denen sehr hohe Dosen Nitrit zugeführt wurden. Mit Ausnahme eines einzigen Versuches (vgl. unten) war aber das Ergebnis negativ.

Im Gegensatz dazu ist die Bildung von Stickoxydhämoglobin bei einer ausreichenden Nitritdosis postmortal oder in den letzten Stadien der Vergiftung immer zu erwarten. Die dazu notwendigen Reduktionsprozesse verlaufen übrigens in Rattenerythrozyten erheblich schneller als in menschlichen Blutkörperchen (Gelinsky[21]).

Einer Ratte wurde subkutan 0,5 g Natriumnitrit in wäßriger Lösung verabreicht. Nach etwa 5—6 Min. wurde das Tier unruhig und zunehmend dyspnoisch. Mehrmals erfolgte Kotabgang und nach 12 Min. setzten Streckkrämpfe ein, die in etwa 1/ Min. vom Tode gefolgt waren. Das Herz wurde sofort freigelegt und Blut durch Punktion entnommen. Nach Zusatz von Natriumzitrat, Hämolyse und Zentrifugieren ließ sich mittels des Spektrodensographen die Lichtabsorptionskurve aufnehmen (Abb. 9). Da dieselbe auch nach Zugabe eines Überschusses von Ferrizyankalium nicht sofort ein reines Hb(3)-Spektrum ergab, mußte das Blut des Tieres entweder Hämiglobinnitrit oder neben Hämiglobin noch Stickoxydhämoglobin und auch noch Oxyhämoglobin enthalten, was aus

der Kurvenverschiebung zu entnehmen ist. Bei einer erneuten Untersuchung nach weiteren 6 Stunden fand sich im Leichenblut in der Hauptsache ein Gemisch von Hämiglobinnitrit und Stickoxydhämoglobin. Hätte das Blut gewöhnliches Hämiglobin enthalten, so müßte sich ein anderer Kurvenverlauf ergeben.

In den übrigen Versuchen gleicher Art konnten wir die Bildung von Hb(3) und Hb(2)-NO beobachten, aber niemals mehr die von Hb(3)-Nitrit.

Zusammenfassung.

Zunächst wurde die Bestätigung älterer Versuche festgestellt, daß 1 Mol Nitrit bei Sauerstoffgegenwart 2 Äquivalente Hämoglobin in Methämoglobin (Hämiglobin) umzuwandeln vermag. Dieses Ergebnis scheint zunächst den Tierversuchen der Literatur an Katzen und Ratten zu widersprechen, doch zeigt eine Analyse dieser Versuche, daß auch in ihnen das Umsetzungsverhältnis die Zahl 1 erheblich überschreitet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung zwischen Nitrit und Oxyhämoglobin in vitro ist sehr stark von der Konzentration an Wasserstoffionen und an Nitrit abhängig. Die Umsetzung verläuft autokatalytisch. Doch kann das Hämiglobin nicht in ähnlicher Weise wie bei der Umsetzung zwischen Chlorat und Hämoglobin als Katalysator wirken, da es die Reaktion bei primärer Zugabe nicht sofort einzuleiten vermag. Die Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration ist auffallend gering.

Bei Zugabe eines größeren Nitritüberschusses bildet sich eine Verbindung zwischen Nitrit und Hämiglobin, die in ihrer Konfiguration den übrigen Hämiglobinverbindungen entsprechen dürfte. Ihre Bildung verläuft streng nach dem Massenwirkungsgesetz, die Dissoziationskonstante beträgt bei einem p_H von 6,7 und 20^0 $10^{-2,5}$. Sie ist erheblich temperaturabhängig. Da die Existenz dieser Verbindung in der Literatur von verschiedenen Seiten nicht erkannt wurde und zu Fehldeutungen der Umsetzung zwischen Nitrit und Hämoglobin geführt hat, wird an Hand einiger Umsetzungen wie der Lichtabsorptionskurve eingehend dargelegt, daß ein Gemisch von Hämiglobin und Stickoxydhämoglobin ausgeschlossen werden kann. Auch ließ sich zeigen, daß sie von einer Anlagerungsverbindung des Stickoxyds an das Hämiglobin zu unterscheiden ist; das Bestehen der letzteren Verbindung konnte nicht mehr sicher bewiesen werden, sie ist mindestens ziemlich unstabil.

Bei der Umsetzung von Hämoglobin mit Nitrit unter Sauerstoffausschluß wird, entsprechend den Literaturangaben, nur 50% des Hämoglobins in Hämiglobin umgewandelt. Das dabei entstehende Stickoxyd wird an den Rest des Hämoglobins angelagert. Bei Zugabe

eines größeren Überschusses von Nitrit verläuft diese Reaktion nicht anders, nur liegt anschließend das Hämiglobin als Nitrithämiglobin vor.

Bei der Umsetzung des Nitrits mit lebenden Blutkörperchen verlaufen alle diese Reaktionen zunächst in entsprechender Weise. Infolge der Reduktionsprozesse in den roten Zellen wird, insbesondere bei einem Nitritüberschuß (nach vorheriger Hämiglobinnitritbildung), aber auch schon bei geringeren Mengen Nitrit die salpetrige Säure zu NO reduziert, das sich dann an gleichfalls durch Reduktion entstandenes Hämoglobin unter Bildung von Stickoxydhämoglobin anlagert. Im Blute von Ratten, die mit hohen Dosen Nitrit vergiftet werden, verlaufen dieselben Reaktionen. In einem Fall konnte die Bildung von Hämiglobinnitrit direkt festgestellt werden.

Literatur.

[1] Meier, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **110**, 241 (1925). — [2] Drabkin, D. L. and I. H. Austin: J. biol. Chem. (Am.) **112**, 51, 67 (1935). — [3] Greenberg, Lester and Haggard: J. biol. Chem. (Am.) **151**, 665 (1944). — [4] Issekutz, B. v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 562 (1939).— [5] Becker, H., F. Dordoni und F. Jung: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 197 (1943). — [6] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [7] Jung, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **192**, 464 (1939). — [8] Jung, F.: Habilitationsschr. Berlin 1944. — [9] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947**, Nr 24/25, 453. — [10] Heubner, W. u. F. Jung: Ber. dtsch. chem. Ges. **1942**, H. 12, 1636. — [11] Haldane: J. Physiol. (Brit.) **21**, 164 (1898). — [12] Haurowitz: Z. physiol. Chem. **138**, 85 (1924). — [13] Hartridge: J. Physiol. (Brit.) **54**, 253 (1920). — [14] Keilin and Hartree: Nature (Brit.) **139**, 548 (1937). — [15] Brooks, Mathilde, Moldenhauer: Proc. roy. Soc., Lond., **132**, 368 (1937). — [16] Warburg, Kubowitz, Christian: Biochem. Z. **227**, 245 (1930). — [17] Kiese: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — [18] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947**, Nr 24/25, 81. — [19] Gutman, Jandorf and Bodansky: J. biol. Chem. (Am.) **169**, 145 (1947). — [20] Havemann, R.: Klin. Wschr. **1944**, 179. — [21] Kiese, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 385 (1947). — [22] Gelinsky: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **195**, 460 (1940).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Holtz).

Über die Wirkung von Nebennierenextrakten auf Blutdruck und Blutzucker*.

Von

Hans-Joachim Schümann.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Juli 1948.)

Durch Untersuchungen von Holtz, Credner und Kroneberg[1] wurde vor einigen Jahren wahrscheinlich gemacht, daß in den Nebennieren neben *Adrenalin* auch das ihm chemisch und pharmakologisch nahestehende entmethylierte Brenzkatechinderivat *Nor-Adrenalin* oder *Arterenol* vorhanden ist.

Die *pressorische* Wirkung blutdruckäquivalenter Mengen Nebennierenextrakt und Adrenalin erfuhr im Blutdruckversuch an der Katze durch Vorbehandlung des Versuchstieres mit *Yohimbin* im Falle des Extrakts eine schwächere und weniger langdauernde Umkehr in eine *depressorische* Wirkung als im Falle des reinen Adrenalins. Die Extrakte verhielten sich wie Adrenalin-Arterenol-Gemische. Arterenol unterscheidet sich u. a. vom Adrenalin darin, daß seine blutdrucksteigernde Wirkung durch Yohimbin nicht *umgekehrt*, sondern nur *abgeschwächt* wird.

Die erwähnten Versuche von Holtz, Credner und Kroneberg erlaubten nur eine *qualitative* Differenzierung zwischen Adrenalin und Arterenol.

Für eine Beurteilung der physiologischen Bedeutung, die dem Vorkommen von Arterenol im Nebennierenmark zukäme, wäre es andererseits notwendig, das *Mengenverhältnis* abschätzen zu können, in welchem die beiden Substanzen im Inkretorgan vorliegen. Hätte das blutdrucksteigernde Prinzip des Nebennierenmarks nur zu einem sehr *geringen* Prozentsatz Arterenol als Komponente besessen, so wäre die Deutung im Sinne des *Intermediärprodukts* für die biologische Ardrenalinsynthese wohl die nächstliegende. Die Anwesenheit *größerer* Arterenolmengen im Nebennierenmark würde jedoch dafür sprechen, daß dem Arterenol ähnlich wie dem Adrenalin auch die Funktion eines *selbständigen hormonalen Faktors* zukomme. Ich habe deshalb versucht über die quantitativen Verhältnisse Aufschluß zu gewinnen.

In einer früheren Arbeit[2] über die hyperglykämische Wirksamkeit von Adrenalin und adrenalinähnlichen Substanzen hatte sich ergeben,

* Siehe auch die kurze Mitteilung H. J. Schümann: „Arterenol im Nebennierenmark". Klin. Wschr. **1948**, 605.

[1] Holtz, P., K. Credner u. G. Kroneberg: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 228 (1944/47). — [2] Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 164 (1949).

daß *Arterenol* bei mindestens gleicher *Blutdruck*-Wirksamkeit am *Blutzucker* etwa 15—20mal schwächer wirksam ist als *Adrenalin*. Wäre deshalb Arterenol in nennenswerter Menge in den Nebennieren vorhanden, so müßten Nebennierenextrakte schwächer glykämisch wirken als blutdruckäquivalente Adrenalinlösungen. Ich habe Nebennierenextrakte am *Katzenblutdruck* gegen reines Adrenalin ausgetestet und blutdruckäquivalente Mengen im *Blutzuckerversuch* am *Kaninchen* miteinander verglichen.

Versuchsergebnisse.

Methodik.

Extraktherstellung. Frische Nebennieren werden nach FROWEIN[3] extrahiert: 2,0 g Nebennieren werden mit 10,0 cm³ n/10 HCl verrieben und nach Zusatz von 30,0 cm³ Aqu. dest. in einem Becherglas zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 3,2 cm³ Na-Acetatlösung 10%-ig wird nochmals kurz aufgekocht. Durch Zentrifugieren wird eine klare Lösung erhalten, die für die Versuche annähernd neutralisiert wird.

Auswertung am Blutdruck. Nebennierenextrakte werden am Blutdruck der mit Pernocton narkotisierten Katze mit *Adrenalin* verglichen. Die Tiere erhalten vor Versuchsbeginn 1 mg/kg Atropin. sulfur.

Blutzuckerversuche. Auf der Basis dieser Auswertungen wurden möglichst gleich schweren Kaninchen Extraktmengen subcutan injiziert, die in *1 cm³* die Blutdruckwirksamkeit von *100 γ Adrenalin* besaßen. Die Tiere hatten vor dem Versuch 15 Stunden gehungert. Die Blutzuckerbestimmungen erfolgten nach der Methode von HAGEDORN-JENSEN (Doppelbestimmungen).

1. Versuche mit Nebennierenextrakten (Mark + Rinde.)

Die Abb. 1 zeigt einen Auswertungsversuch mit einem aus *Schweinenebennieren* hergestellten Extrakt am *Blutdruck* der Katze. 0,1 cm³ des *Extrakts* ist etwas wirksamer als 10 *γ Adrenalin*. 1,0 cm³ des Extrakts ist also mindestens 100 *γ* Adrenalin blutdruckäquivalent.

Die Abb. 2 zeigt die *hyperglykämische* Wirkung von 1,0 cm³/kg des *Extrakts* und von 100 *γ*/kg *Adrenalin* am Kaninchen. Extrakt und Adrenalin wurden gleichzeitig je 3 Kaninchen injiziert. Die Gipfelpunkte der Blutzuckerkurven, die wohl in Abhängigkeit von den Resorptionsverhältnissen verschieden schnell erreicht werden, lagen in den Adrenalinversuchen zwischen 250 und 270 mg-%, in den Versuchen mit Nebennierenextrakt zwischen 180 und 190 mg-% (vgl. Tabelle 1).

Die deutlich schwächere glykämische Wirksamkeit des Extraktes bei gleicher Blutdruckwirksamkeit macht es deshalb wahrscheinlich, daß die biologisch wirksame Substanz nicht reines Adrenalin ist, sondern daß im Extrakt eine Substanz vorhanden ist, die bei gleicher *Blutdruckwirksamkeit* den *Blutzuckerspiegel* schwächer beeinflußt als

[3] FROWEIN, B.: Biochem. Z. **134**, 558 (1923).

Adrenalin. Diese Substanz könnte *Arterenol* sein, von dem schon in der Einleitung gesagt wurde, daß es bei mindestens gleicher *pressorischer* Wirksamkeit 15—20mal schwächer *hyperglykämisch* wirksam ist.

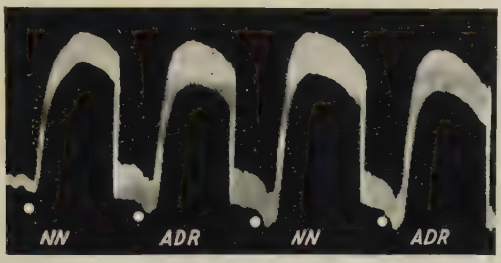


Abb. 1. Auswertung eines Extraktes aus Schweinenebenniere gegen Adrenalin am Blutdruck der Katze. Katze 1,8 kg. Pernoctonnarkose. *NN* = 0,1 cm³ Extrakt; *ADR* = 10 γ Adrenalin. — 0,1 cm³ des Extraktes ist etwas wirksamer als 10 γ Adrenalin.

Gegen diese Annahme läßt sich einwenden, daß die schwächere Beeinflussung des Blutzuckerspiegels durch den Extrakt nicht auf der Anwesenheit einer am *Blutdruck* zwar *gleich* wirksamen aber *glykämisch*

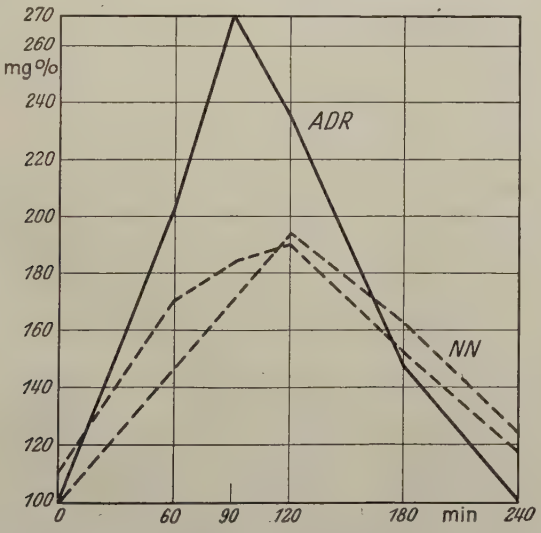


Abb. 2. Hyperglykämische Wirksamkeit blutdruckäquivalenter Mengen Schweinenebennierenextrakt und Adrenalin am Kaninchen. *ADR* = 100 γ/kg Adrenalin subkutan. *NN* = 1,0 cm³/kg Nebennierenextrakt subkutan.

weniger wirksamen Substanz beruhe, sondern dadurch nur vorgetäuscht sei, daß vielleicht aus der Nebennieren*rinde* stammende und in den Extrakt übergegangene Stoffe die Wirkung des Nebennierenadrenalins auf den *Blutdruck*, nicht aber auf den *Blutzucker* potenzierten. Die

den Kaninchen je Kilogramm Körpergewicht injizierten Extraktmengen wären dann zwar mit 100 γ je Kilogramm Adrenalin *blutdruckäquivalent* gewesen, wie ja aus der Auswertung an der Katze hervorgeht, sie hätten aber trotzdem weniger als 100 γ Adrenalin *enthalten*. Um diesen Einwand zu entkräften, habe ich Versuche mit Extrakten aus Nebennieren*mark* gemacht. In den meisten Fällen wurden die Markextrakte außerdem noch dialysiert.

2. Versuche mit Dialysaten von Nebennierenmarkextrakten.

Methodik.

Herstellung der Extrakte. 5,0 g Mark aus *Rindernebenniere* wurden nach der etwas modifizierten Methode von FROWEIN[3] mit 2,5 cm³ n/1 HCl, 25,0 cm³ Aqu. dest. und 8,0 cm³ 10%iger Na-Acetatlösung extrahiert.

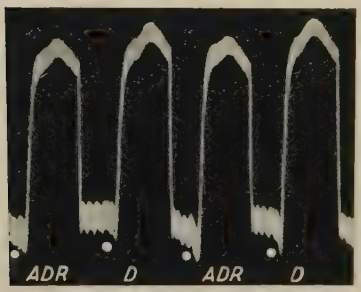


Abb. 3. Auswertung eines Dialysats aus Rindernebennierenmark-Extrakt gegen Adrenalin am Katzenblutdruck. Katze 2,0 kg. Pernoctonnarkose. *D* = 0,35 cm³ Dialysat 1/40; *ADR* = 5 γ Adrenalin. — 0,35 cm³ des 40fach verdünnten Dialysates sind etwas wirksamer als 5 γ Adrenalin.

Herstellung der Dialysate. 10,0 cm³ dieser Extrakte wurden im Eisschrank 16 Stunden gegen 5,0 cm³ folgender Lösung dialysiert: 2,5 cm³ n/1 HCl, 25,0 cm³ NaCl 0,45%ig und 8,0 cm³ Na-Acetatlösung 10%ig. Als Dialysiervorrichtung dienten kleine *Bechergläschen*, deren Öffnung nach Einfüllen von je 10,0 cm³ Markextrakt mit einer Cellophanmembran abgeschlossen wurde, und die in je 5,0 cm³ Außenflüssigkeit eintauchten.

Die Abb. 3 zeigt wiederum einen Auswertungsversuch am Blutdruck der Katze. *Rindernebenniere* enthält weit mehr blutdrucksteigernde Substanz als *Schweinenebenniere*. Das Dialysat aus Nebennierenmark wurde in diesem Versuch auf das 40fache verdünnt. 0,35 cm³ des verdünnten *Dialysats* waren etwas wirksamer als 5 γ *Adrenalin* (Abb. 3). 100 γ Adrenalin würden demnach 7,0 cm³ des aufs 40fache oder 0,7 cm³ des aufs 4fache verdünnten Dialysats entsprechen. Im *Blutzuckerversuch* am Kaninchen wurde deshalb 0,7 cm³/kg des 4fach verdünnten Markdialysats, mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,0 cm³ aufgefüllt, subkutan injiziert.

Die Abb. 4 zeigt das Ergebnis des Blutzuckerversuchs. Die *Mark*dialysate verhalten sich wie die Gesamtextrakte in den früheren Versuchen: sie sind deutlich weniger wirksam als Adrenalin in blutdruckäquivalenter Menge. Die Versuche stützen deshalb die Annahme, daß im Nebennierenmark außer *Adrenalin* noch eine zweite glykämisch weniger wirksame Substanz vorhanden ist und daß diese Substanz *Arterenol* ist. In die gleiche Richtung weisen die Ergebnisse von Versuchen mit

Dialysaten von *Gesamtextrakten* aus Schweine- und Rindernebennieren, die in der Tabelle 1 (S. 481) unter den Versuchsnummern 6, 7 und 8 aufgeführt sind.

Um Anhaltspunkte für die Beurteilung des *Mengenverhältnisses* zu gewinnen, in dem Adrenalin und Arterenol im Nebennierenmark vorkommen, habe ich Versuche mit Adrenalin-Arterenol-*Gemischen* gemacht.

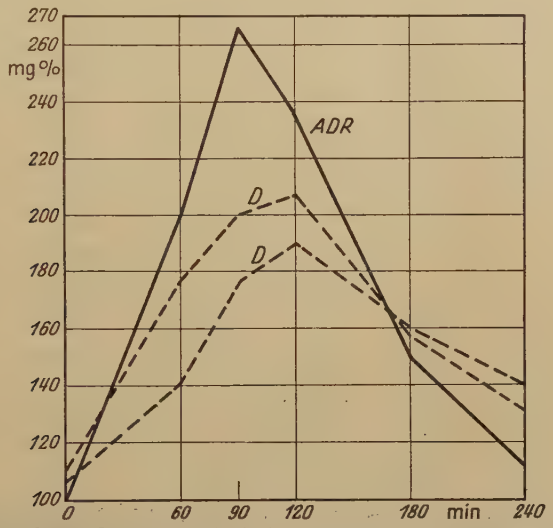


Abb. 4. Hypergiykämische Wirksamkeit blutdruckäquivalenter Mengen eines Dialysats aus Rindernebennierenmark-Extrakt und Adrenalin. *ADR* = 100 γ/kg Adrenalin subkutan. *D* = 1,0 cm³/kg Dialysat subkutan.

3. Versuche mit Adrenalin-Arterenolgemischen.

Aus der Abb. 5 ist zunächst die hyperglykämische Wirkung von 100 γ/kg und von 50 γ/kg Adrenalin zu ersehen. Die blutzuckererhöhende Wirkung von 50 γ/kg *Adrenalin* wird durch gleichzeitige Injektion von 50 γ/kg *Arterenol* nicht beeinflußt. Das 15—20fach schwächer wirksame Arterenol ist, wie frühere Versuche gezeigt hatten, in Dosierungen von 50 γ oder auch 100γ/kg wirkungslos, so daß bei der Injektion des aus 50 γ Adrenalin und 50 γ Arterenol bestehenden Gemisches, das am Blutdruck mindestens so wirksam sein würde wie 100 γ Adrenalin, im Blutzuckerversuch nur die Adrenalinkomponente zur Auswirkung kommt. Ein Gemisch von 75% Adrenalin und 25% Arterenol ist deshalb erwartungsgemäß auch noch deutlich weniger hyperglykämisch wirksam als 100 γ Adrenalin und stimmt in seiner Wirkung annähernd überein mit der Blutzuckerwirksamkeit der Nebennierenextrakte und -dialysate, wie aus der direkten Nebeneinanderstellung in der Abb. 6 hervorgeht.

Die Tabelle 1 gibt eine Berechnung des Durchschnitts aus den *Höchstwerten* der einzelnen Blutzuckerkurven.

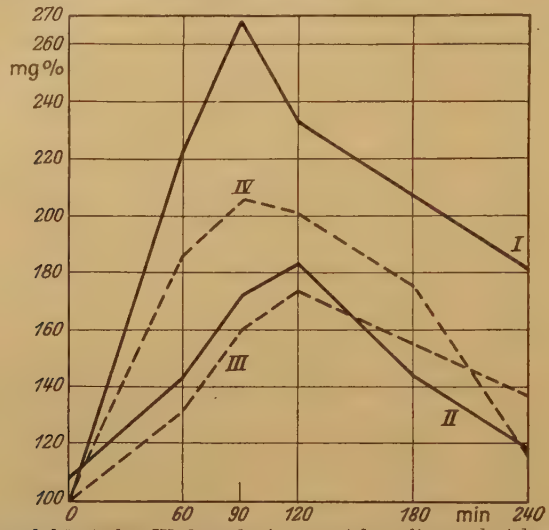


Abb. 5. Hyperglykämische Wirksamkeit von Adrenalin und Adrenalin-Arterenol-gemischen am Kaninchen. 100 γ/kg Adrenalin subkutan (*I*). 50 γ/kg Adrenalin subkutan (*II*). 50γ l-Adrenalin + 50 γ dl-Arterenol/kg subkutan (*III*). 75 γ l-Adrenalin + 25 γ dl-Arterenol/kg subkutan (*IV*).

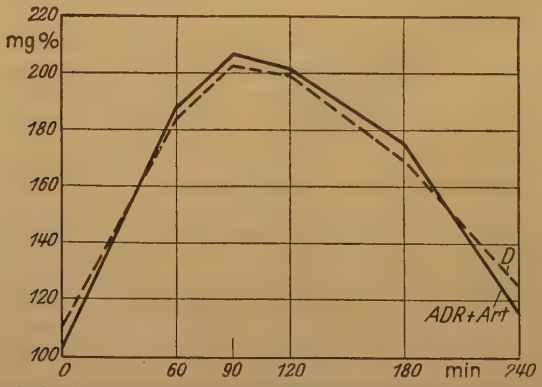


Abb. 6. Vergleich der hyperglykämischen Wirksamkeit eines mit 100 γ Adrenalin blutdruckäquivalenten Dialysats aus Schweinenebennieren-Extrakt und eines Gemisches von 75% Adrenalin und 25% Arterenol. D = 1,0 cm³/kg Dialysat subkutan. *ADR* + *Art* = 75 γ l-Adrenalin + 25 γ dl-Arterenol/kg subkutan.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die schon in der erwähnten Arbeit von HOLTZ, CREDNER und KRONEBERG[1] geäußerte Vermutung, daß das blutdrucksteigernde Prinzip des *Nebennierenmarks* nicht nur aus *Adrenalin* bestehe, sondern daneben *Arterenol* als Komponente enthalte, findet eine Stütze durch

Tabelle 1. *Hyperglykämische Wirkung von Adrenalin, Adrenalin-Arterenol-Gemischen, sowie von blutdruckäquivalenten Nebennierenextrakten bzw. -dialysaten. (Ergänzende, nicht in den Kurven verzeichnete Versuche. Für die Berechnung des Mittels in der letzten Spalte wurden diese jedoch berücksichtigt.)*

Kaninchen Nr.	Gewicht in kg	Subkutane Injektion von	mg-% Blutzucker nach Minuten 0	60	90	120	180	240	300	Mittel der Höchstwerte
1	3,0	100 γ/kg Adrenalin	99	169	227	*268*	151	169	107	*263*
2	2,3		106	171	216	*250*	191	137	105	
3	2,5		98	225	*268*	232	209	183	131	
4	1,9		102	212	228	245	*264*	239	188	
5	2,1	Extrakt aus Schweinenebennieren (Mark + Rinde)	90	154	*178*	166	149	127	110	*187*
6	2,4	Extrakt aus Schweinenebennieren (Dialysate)	109	166	186	*197*	158	119	92	*195*
7	2,7		113	*203*	197	193	152	132	116	
8	2,9	Extrakt aus Rindernebennieren (Dialysat)	109	173	174	*177*	156	137	119	
9	2,6	Extrakt von Rindernebennierenmark (Dialysat)	105	178	195	*209*	169	120	99	*202*
10	2,6	50 γ/kg Adrenalin	103	124	142	*164*	154	125	99	*173*
11	2,3	50 γ/kg Adrenalin	105	162	*174*	163	121	121	—	*181*
12	2,3	+ 50 γ/kg Arterenol	97	168	185	*195*	139	108	—	
13	2,7	75 γ/kg Adrenalin + 25 γ/kg Arterenol	103	193	204	*212*	154	122	—	*209*

meine *Blutzuckerversuche* an Kaninchen, deren Grundlage die im Vergleich mit Adrenalin fast 20fach schwächere hyperglykämische Wirksamkeit des Arterenols ist. Blutdruckäquivalente Nebennierenextrakte und Dialysate aus solchen Extrakten erhöhten in blutdruckäquivalenter Menge den Blutzuckerspiegel deutlich weniger stark als Adrenalin. Ihre glykämische Wirksamkeit entsprach derjenigen eines aus 75% Adrenalin und 25% Arterenol bestehende Gemisches. Auf Grund dieser Ergebnisse wäre die zu Anfang aufgeworfene Frage nach der *physiologischen Bedeutung* des in der Nebenniere etwa vorhandenen Arterenols in dem Sinne zu beantworten, daß die verhältnismäßig großen neben Adrenalin vorkommenden Arterenolmengen wohl kaum mit der Vorstellung vereinbar sind, dem Nebennierenarterenol komme nur die Funktion der kurzlebigen chemischen *Adrenalinvorstufe* zu, sondern

vielmehr dafür sprechen, daß wie *Adrenalin* so auch *Arterenol* ein selbständiges *Hormon* des Nebennierenmarks ist. Diese Auffassung findet dann eine weitere Stütze in den Ergebnissen einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit von P. HOLTZ und H. J. SCHÜMANN[4], in der gezeigt werden konnte, daß es im Gefolge einer *Karotissinusentlastung* zu einer isolierten, adrenalin-unabhängigen *Ausschüttung* von Arterenol aus den Nebennieren kommt.

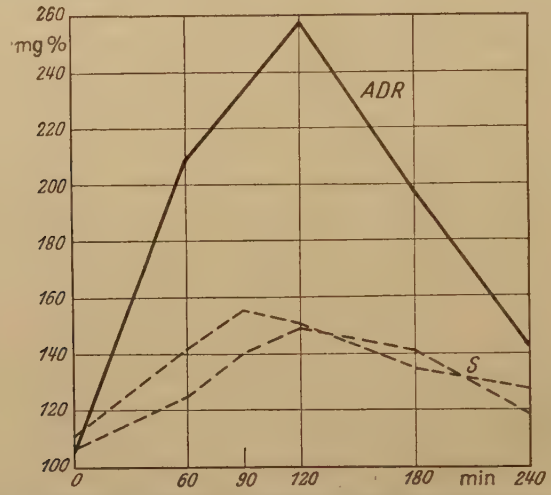


Abb. 7. Rindernebennierenschnitte in Phosphatpuffer suspendiert: Hyperglykämische Wirksamkeit blutdruckäquivalenter Mengen Suspensionsflüssigkeit und Adrenalin. *ADR* = 100 γ/kg Adrenalin subkutan. *S* = 1,0 cm³/kg Suspensionsflüssigkeit subkutan.

Die schon in dieser Arbeit gestellte Frage nach dem *Mechanismus*, welcher dieser isolierten Arterenolabgabe zugrunde liegt und sie ermöglicht, kann auch durch meine Versuche nicht endgültig beantwortet werden; ein Versuch jedoch, der mit einer etwas anderen Versuchsanordnung als bisher ausgeführt wurde, läßt es möglich erscheinen, daß die *Bindung*, in der *Arterenol* im Nebennierenmark sich befindet, eine weniger feste ist, als diejenige des *Adrenalins*, und daß Arterenol deshalb vielleicht schon unter der Einwirkung solcher Reizintensitäten in Freiheit gesetzt wird, die für eine Abgabe von Adrenalin nicht ausreichen.

In dem in der Abb. 7 dargestellten Versuch waren *Rasiermesserschnitte* aus Rindernebennieren, in einer Pufferlösung suspendiert, eine Stunde lang bei 37° in der WARBURG-Apparatur geschüttelt worden. Die Suspensionsflüssigkeit wurde dann anschließend mit einer blutdruckäquivalenten Adrenalinmenge im Blutzuckerversuch am

[4] HOLTZ, P. u. H. J. SCHÜMANN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. 206, 49 (1949).

Kaninchen verglichen. Die übereinstimmend an zwei verschiedenen Tieren erhaltene ganz besonders geringe Wirkung spricht dafür, daß von dem in weit geringerer Menge vorhandenen *Arterenol* ein höherer Prozentsatz in die Suspensionsflüssigkeit hineindiffundierte als von dem in weit größerer Menge vorhandenen *Adrenalin*; Arterenol dürfte sich deshalb vielleicht in lockererer, leichter lösbarer Bindung im Nebennierengewebe befinden als Adrenalin.

Zusammenfassung.

1. Nebennierenextrakte und -dialysate werden in *Blutzuckerversuchen* an *Kaninchen* mit *blutdruckäquivalenten* Adrenalinmengen verglichen. Die Extrakte sind deutlich weniger hyperglykämisch wirksam als Adrenalin.

2. *Arterenol*, das entmethylierte Adrenalin, ist, wie aus früheren Versuchen hervorgeht, bei mindestens *gleicher Blutdruckwirksamkeit* 15—20fach *weniger blutzuckerwirksam* als Adrenalin. Die Ergebnisse von Vergleichsversuchen mit Adrenalin-Arterenolgemischen sind vereinbar mit der Annahme, daß das wirksame Prinzip der Nebennierenextrakte aus 75% Adrenalin und 25% Arterenol besteht.

3. Die verhältnismäßig großen im Nebennierenmark vorhandenen Arterenolmengen sprechen dafür, daß dem Arterenol nicht nur die Funktion des chemischen *Intermediärproduktes* der Adrenalinsynthese, sondern diejenige eines *selbständigen, neuen Hormons* des Nebennierenmarks zukommt.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Holtz).

Über den Arterenolgehalt des Nebennierenmarks. Versuche mit Hormonkristallisaten.

Von

Peter Holtz und Hans-Joachim Schümann.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Juli 1948.)

In der vorstehenden Arbeit von H. J. Schümann[1] „Über die Wirkung von Nebennierenextrakten auf Blutdruck und Blutzucker" wurden Belege dafür gegeben, daß die biologische Wirksamkeit von Nebennierenmarkextrakten nicht nur auf ihrem Gehalt an *Adrenalin* beruhen kann. Die durch Nebennierenextrakte an Kaninchen verursachte *Hyperglykämie* ist deutlich schwächer als diejenige, die von reinen Adrenalinlösungen in blutdruckäquivalenter Dosierung hervorgerufen wird. Unter Berücksichtigung des früheren Befundes[2], daß *Arterenol*, — am Blut*druck* der Katze mit Adrenalin mindestens gleich wirksam —, auf den *Blutzucker*spiegel des Kaninchens eine fast 20fach schwächere Wirkung als Adrenalin ausübt, war aus den Versuchsergebnissen auf das Vorhandensein größerer Arterenolmengen im Nebennierenmark geschlossen worden. Die Ergebnisse von Vergleichsversuchen[3] mit Adrenalin-Arterenolgemischen waren vereinbar mit der Annahme, daß die biologische Wirksamkeit der Extrakte zu ungefähr 25% auf ihrem Gehalt an Arterenol beruhe.

Gegen diese Annahme ist der Einwand möglich, nicht *Arterenol*, sondern ein anderes in den Drüsenextrakten neben Adrenalin enthaltenes und ihm nahestehendes, aber glykämisch weniger wirksames *Amin* sei die Ursache für die Diskrepanz zwischen Blutdruck- und Blutzuckerwirkung. Vor allem war an *Oxytyramin* zu denken, in dem nach kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von Holtz und Kroneberg[4] die physiologisch wichtigste Muttersubstanz für die im Nebennierenmark erfolgende Adrenalinsynthese zu erblicken ist, und das, wie schon weiter zurückliegende Untersuchungen[5] ergeben hatten, im Vergleich mit Adrenalin bei 30—40fach schwächerer *Blutdruckwirkung* an der *Katze* eine fast 100fach schwächere *Blutzuckerwirkung* am *Kaninchen* besitzt. Die in früheren Untersuchungen[6] gemachte Beobachtung, daß Oxytyramin in den hier in Frage kommenden Mengen — anders als bei *Katze* und *Hund* —, am *Kaninchen* reine

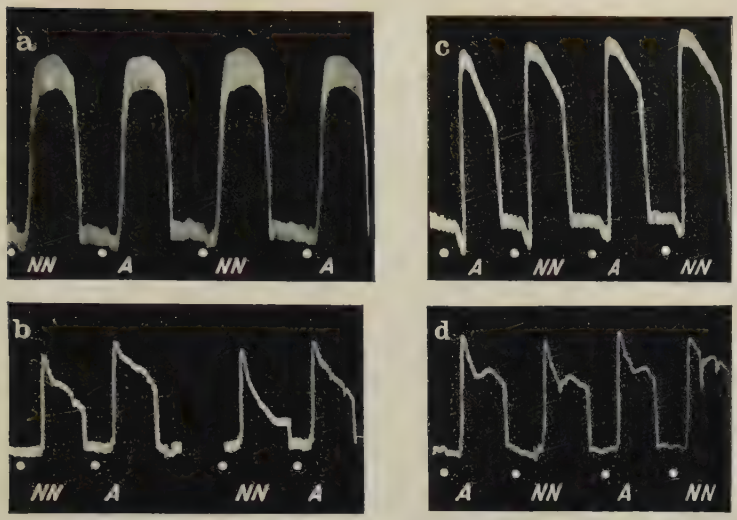


Abb. 1 a—d. Nebennierenextrakte — am Katzenblutdruck mit Adrenalin gleichwirksam — sind am Kaninchenblutdruck schwächer wirksam.
a Katze, 2 kg. Pernocton. b Kaninchen, 3 kg. Urethan.
NN = 0,3 cm³ Extrakt aus Rindernebennieren; *A* = 6 γ Adrenalin.
c Katze, 2,4 kg. d Kaninchen, 2,5 kg.
NN = 0,35 cm³ Dialysat aus Nebennierenmarkextrakt; *A* = 5 γ Adrenalin.

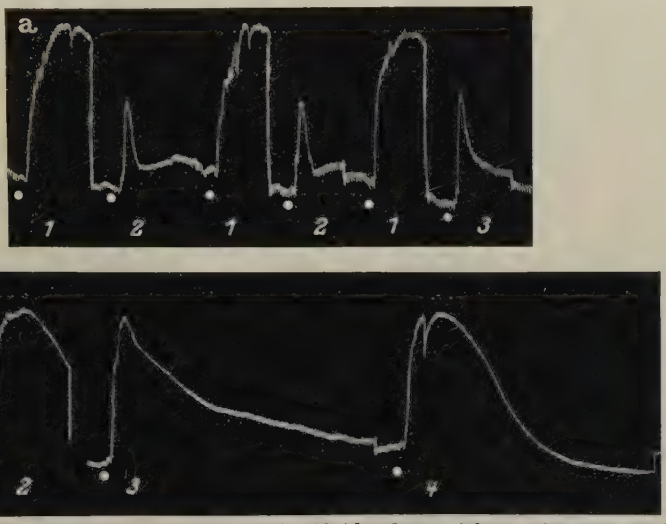


Abb. 2 a u. b. Arterenol (dl-) ist am Kaninchenblutdruck ungefähr 5mal weniger wirksam als Adrenalin (l-). — Kaninchen, 2,3 kg Urethannarkose.
a *1* = 10 γ Adrenalin; *2* = 10 γ Arterenol; *3* = 20 γ Arterenol.
b *1* = 30 γ Arterenol; *2* = 6 γ Adrenalin; *3* = 40 γ Arterenol; *4* = 8 γ Adrenalin.

Blutdruck*senkungen* hervorruft, legte es nahe, Oxytyramin als Bestandteil der Nebennierenextrakte im Blutdruckversuch am Kaninchen auszuschließen. Würde die im Vergleich mit Adrenalin schwächere

Blutzuckerwirkung der Extrakte auf einer Beimengung von Oxytyramin beruhen, so müßten am *Katzenblutdruck* gegen Adrenalin ausgewertete und hier *blutdruckäquivalente* Extraktmengen am *Kaninchenblutdruck* weniger wirksam sein. Obwohl sie das tatsächlich waren (Abb. 1), spricht das Ergebnis nicht gegen *Arterenol*, da Arterenol beim Kaninchen, wenn auch keine blutdruck*senkende*, so doch eine — nicht erwartete — weit schwächere blutdrucksteigernde Wirkung als Adrenalin ausübt. Die Abb. 2 zeigt, daß zur Erzielung gleicher Wirkungen eine fast 5fach höhere Dosierung erforderlich ist.

Der sicherste Beweis für das Vorkommen von Arterenol im Nebennierenmark wäre seine *chemische* Isolierung.

Mit dem Ziel der chemischen Reindarstellung aus dem *Drüsenmaterial* haben wir in Zusammenarbeit mit Herrn Professor W. Langenbeck vom Chemischen Institut und seinem Mitarbeiter, Herrn H. Le Blanc Untersuchungen begonnen. Über die ersten Ergebnisse der chemischen und biologischen Versuche haben wir gemeinsam in einer kurzen Mitteilung berichtet[7]. Sie erlauben schon jetzt, *Oxytyramin* und ähnliche, vielleicht als Adrenalinvorstufen in Frage kommende Amine mit Sicherheit auszuschließen.

Versuche.

1. Gewinnung von Hormonkristallisaten aus Nebennieren.

Zusammen mit W. Langenbeck und H. Le Blanc wurden 1430 g *Rindernebennieren* nach dem von J. J. Abel[8] angegebenen Verfahren zur Darstellung von Adrenalin aufgearbeitet. Das Drüsenmaterial wurde mit Alkohol, der auf 5 Liter 175 g Trichloressigsäure enthielt, mehrfach extrahiert. Aus den vereinigten und bei 50—60° C durch Vakuumdestillation eingeengten Extrakten erhielten Langenbeck und Le Blanc durch Fällung mit Ammoniak unter Ausschluß von Sauerstoff ungefähr 4 g „*Rohadrenalin*" mit einem Aschegehalt von 17%. Sie lösten 1 g des Rohproduktes in 10%iger Salzsäure und versetzten mit einer gesättigten Lösung von $KH \cdot CO_3$ in geringem Überschuß. Von den in großer Menge sofort ausfallenden *anorganischen* Bestandteilen wurde abgenutscht. Aus dem in H_2-Atmosphäre bei Eisschranktemperatur gehaltenen *Filtrat* kristallisierten nach 40 Stunden 350 mg eines 17% Asche enthaltenden Gemisches aus *(Fraktion A)*, nach weiteren 24 Stunden 77 mg eines praktisch aschefreien Kristallpulvers *(Fraktion B)*.

2. Die Blutdruckwirkung der aus Nebennieren gewonnenen Hormonkristallisate.

a) Katzenblutdruck. Aus analytisch abgewogenen Mengen der *Hormonfraktionen* A und B stellten wir wäßrige Standardlösungen 1:1000 her und verglichen diese in passenden Verdünnungen am Blutdruck der Katze mit *Adrenalin*lösungen gleicher Konzentration.

Arterenol ist an der mit Pernocton narkotisierten Katze mindestens ebenso blutdruckwirksam wie *Adrenalin*, meistens etwas wirksamer. Das für die in der Abb. 4 dargestellten Versuche benutzte Versuchstier

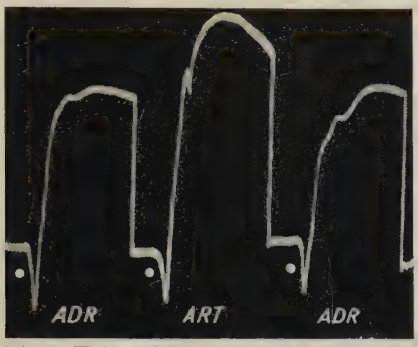


Abb. 3. dl-Arterenol ist am Katzenblutdruck stärker wirksam als Adrenalin. Katze, 2,0 kg. Pernocton. — *ADR* = 10 γ l-Adrenalin; *ART* = 10 γ dl-Arterenol.

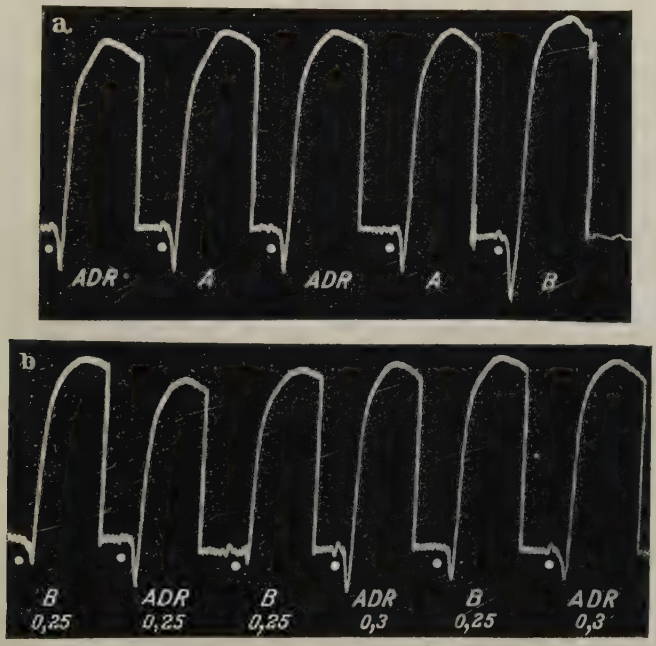


Abb. 4a u. b. Blutdruckwirkung der aus Rindernebennieren gewonnenen Hormonkristallisate A und B an der Katze.
a *ADR* = 0,3 cm³ Adrenalin 1:50000; *A* = 0,3 cm³ Fraktion A 1:50000; *B* = 0,3 cm³ Fraktion B 1:50000.
b *B* = 0,25 cm³ Fraktion B 1:50000; *ADR* = 0,25 bzw. 0,3 cm³ Adrenalin 1:50000.

reagierte, wie die Abb. 3 zeigt, ganz besonders empfindlich auf Arterenol: dieses wirkt hier deutlich stärker blutdrucksteigernd als die gleiche Adrenalinmenge.

Die Abb. 4 enthält nun das Ergebnis der Versuche, in denen die Fraktionen A und B in *gewichtsgleicher* Menge mit Adrenalin verglichen wurden. Alle Versuchslösungen haben die Konzentration 1:50000 (0,25 cm³ = 5 γ, 0,3 cm³ = 6 γ). Die *Fraktion A* ist trotz ihres Aschegehaltes von 17% praktisch von gleicher Wirksamkeit wie reines Adrenalin (Abb. 4a), die aschefreie *Fraktion B* ist deutlich wirksamer als eine gewichtsgleiche Adrenalinmenge (Abb 4a, besonders Abb. 4b): 0,25 cm³ 1:50000 von Fraktion B sind mindestens so wirksam wie 0,3 cm³ 1:50000 Adrenalin. Beide Hormonfraktionen müssen deshalb — neben Adrenalin — eine andere Substanz enthalten, die *blutdruckwirksamer* ist als Adrenalin. Diese Substanz kann nicht

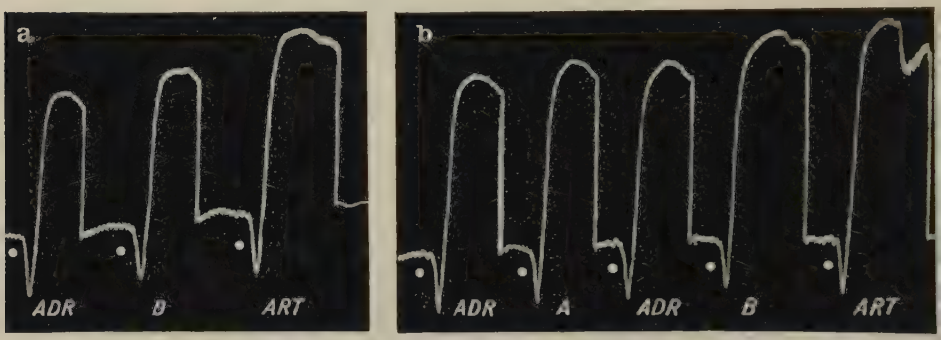


Abb. 5a u. b. Blutdruckwirkung von l-Adrenalin, dl-Arterenol, Hormonfraktion A und B. — Katze, 2,6 kg. Pernocton.
a *ADR* = 0,1 cm³ Adrenalin 1:20000; *B* = 0,1 cm³ Fraktion B 1:20000; *ART* = 0,1 cm³ Arterenol 1:20000.
b *ADR* = 0,15 cm³ Adrenalin; *A* = 0,15 cm³ Fraktion A; *B* = 0,15 cm³ Fraktion B; *ART* = 0,15 cm³ Arterenol.

Oxytyramin, *Tyramin* oder *Phenyläthylamin* sein, da diese Amine am Katzenblutdruck 30—50mal weniger wirksam sind, sie könnte *Arterenol* sein, das — wie aus der Abb. 3 hervorging —, deutlich wirksamer als Adrenalin ist.

1 mg der *Hormonfraktion B* ist am Katzenblutdruck wirksamer als 1 mg *Adrenalin*. Wäre die Wirksamkeit der Fraktion B zu 25% durch *Arterenol* bedingt, so würden weniger als 250 γ Arterenol genügen, um 750 γ Adrenalin zu komplettieren. Wäre *Oxytyramin*, das wirksamste der anderen in Erwägung gezogenen Amine, die „zweite Substanz" des Hormonkristallisates B, so würden bei seiner 30fach schwächeren Blutdruckwirksamkeit 7500 γ hierzu erforderlich sein. Nicht *1 mg*, sondern mehr als *8 mg* der Hormonfraktion B hätten dann erst die mit *1 mg* Adrenalin gleichwirksame Menge dargestellt.

Die Abb. 5a zeigt noch einmal das Wirksamkeitsverhältnis gewichtsgleicher Mengen *Adrenalin*, *Fraktion B* und *Arterenol*, die Abb. 5b dasjenige gewichtsgleicher Mengen *Adrenalin*, *Fraktion A*, *Fraktion B* und *Arterenol*.

b) Kaninchenblutdruck. Vergleichsversuche am Kaninchenblutdruck mit den Hormonkristallisaten und Adrenalin bzw. Adrenalin-

Arterenolgemischen erlauben eine *quantitative* Abschätzung des in den Kristallgemischen neben Adrenalin enthaltenen Arterenols. Die *Hormonfraktion B*, die am *Katzenblutdruck stärker* als Adrenalin wirkte, hat am *Kaninchenblutdruck* eine deutlich *schwächere* Wirksamkeit (Abb. 6a). Die Fraktion B (Abb. 6b, *4*) ist *wirksamer* als ein aus je 50% *Adrenalin* und *Arterenol* bestehendes Gemisch (Abb. 6b, *3*),

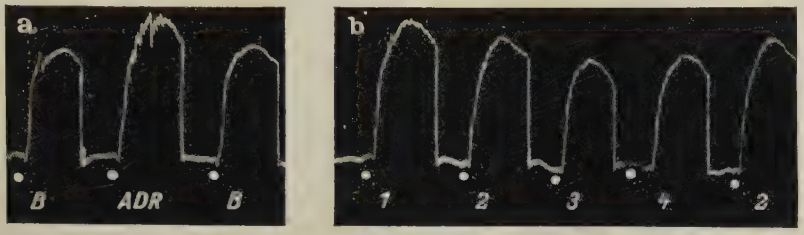


Abb. 6a u. b. Blutdruckwirkung der Hormonfraktion B am Kaninchen.
a Die Fraktion B ist schwächer wirksam als Adrenalin. *B* = 0,2 cm³ Fraktion B 1:20000; *ADR* = 0,2 cm³ Adrenalin 1:20000 (10 γ).
b Auswertung gegen Adrenalin-Arterenolgemische. *1* = 0,2 cm³ Adrenalin 1:20000; *2* = 0,15 cm³ Adrenalin + 0,05 cm³ Arterenol; *3* = 0,10 cm³ Adrenalin + 0,10 cm³ Arterenol; *4* = 0,2 cm³ Fraktion B 1:20000.

sie ist *weniger wirksam* als ein aus 75% Adrenalin und 25% Arterenol bestehendes Gemisch (Abb. 6b, *2*). Ihr Arterenolgehalt müßte zwischen 25 und 50% liegen.

3. Die Beeinflussung der Blutdruckwirkung durch Yohimbin.

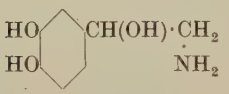
Wie *Ergotoxin* so verursacht auch *Yohimbin* eine Umkehr der blutdrucksteigernden Wirkung des *Adrenalins*, während die Arterenol-

Abb. 7. Beeinflussung der Blutdruckwirkung durch Yohimbin. Katze, 3 kg. Pernoctonnarkose. — 4 mg/kg Yohimbinhydrochlorid intramuskulär. —
ADR = 0,6 cm³ Adrenalin 1:50000; *ADR/ART* = 0,4 cm³ Adrenalin + 0,2 cm³ Arterenol; *B* = 0,5 cm³ Fraktion B 1:50000; *ART* = 0,4 cm³ Arterenol 1:50000.

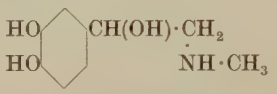
wirkung nur abgeschwächt wird. Diese verschiedene Beeinflußbarkeit durch Yohimbin hatte uns[9] schon vor mehreren Jahren in Untersuchungen über das blutdruckmäßige Verhalten von Nebennierenextrakten vermuten lassen, daß die Extrakte *arterenolhaltig* seien; nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit *Yohimbin* war die *depressorische* Wirkung der Extrakte schwächer als diejenige reiner Adrenalinlösungen, die vorher eine gleichstarke *pressorische* Wirksamkeit besessen hatten. Aus dem Versuch der Abb. 7 ist zu ersehen, daß

wie die Nebennierenextrakte unserer früheren Versuche so jetzt die kristallisierte Hormonfraktion B in einer Dosierung, welche zu Beginn des Versuches in bezug auf den pressorischen Effekt mit den verabfolgten Adrenalin- bzw. Arterenoldosen vergleichbar war, am mit Yohimbin vorbehandelten Tier eine deutlich schwächere und flüchtigere Blutdrucksenkung hervorruft als die entsprechende Adrenalinmenge (Abb. 7, *3*). Die von der Fraktion B verursachte Blutdrucksenkung entspricht derjenigen eines Adrenalin-Arterenolgemisches, wie es in der Abb. 7 bei *2* (*ADR/ART*) injiziert wurde. Reines Arterenol wirkt, wie schon gesagt, auch nach Yohimbin noch blutdrucksteigernd, seine Wirkung wird nur abgeschwächt (Abb. 7, *5*).

4. Der Aminostickstoffgehalt der aus Nebennieren gewonnenen Hormonfraktionen.



Arterenol



Adrenalin

Im Gegensatz zu *Adrenalin* müßte der gesamte Stickstoffgehalt des *Arterenols* als NH_2-Stickstoff nach van Slyke bestimmbar sein. Die van Slyke-Werte der Hormonkristallisate würden deshalb einen Rückschluß zulassen auf den *Prozentsatz*, in dem Arterenol neben Adrenalin in ihnen vorhanden ist. Die Tabelle 1 enthält die für die Fraktionen A und B gefundenen Werte, die dafür sprechen, daß die Fraktion A ungefähr 20%, die Fraktion B ungefähr 30% Arterenol enthält. Die Anreicherung von Arterenol in der später auskristallisierten Fraktion B findet vermutlich ihre Erklärung darin, daß Arterenol leichter wasserlöslich ist und deshalb schwerer auskristallisiert als Adrenalin.

Tabelle 1. *Aminostickstoff der aus Nebennieren gewonnenen Hormonkristallisate: Fraktion A und B (auf aschefreie Substanz berechnet).* (Nach W. Langenbeck und H. Le Blanc.)

	Aminostickstoff in %		Arterenol in %
	gefunden * nach van Slyke	berechnet für Arterenol	berechnet aus NH_2-Stickstoff
Fraktion A	1,52	8,28	18,2
Fraktion B	2,60		31,5

* Auf aschefreie Substanz berechnet.

5. Die Blutzuckerwirkung der Hormonkristallisate.

Die nach früheren Untersuchungen von H. J. Schümann[2] fast 20fach schwächere *glykämische* Wirksamkeit des Arterenols ließ den Blutzuckerversuch am Kaninchen als besonders geeignet erscheinen zur *Differenzierung* zwischen Adrenalin und Arterenol. Die Ergebnisse der *Blutzuckerversuche* stimmen mit den *chemischen* Befunden des vorhergehenden Abschnittes — *Aminostickstoffwerte* der

Fraktionen A und B — überein und stützen damit die Annahme, daß die Hormonkristallisate neben Adrenalin ungefähr 20—30% Arterenol enthalten.

Die Abb. 8 zeigt, daß die beiden Fraktionen A und B deutlich schwächer glykämisch wirksam sind als eine blutdruckäquivalente Adrenalindosis. Die Fraktion A mit dem *niedrigeren* Aminostickstoff- und Arterenolgehalt — 1,52 bzw. 18,2% — ist *wirksamer*, die Fraktion B

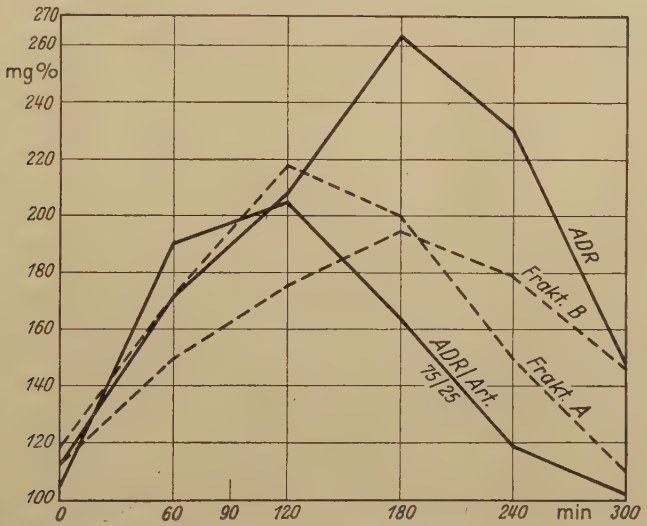


Abb. 8. Hyperglykämische Wirkung von Adrenalin und blutdruckäquivalenten Mengen der Hormonfraktionen A und B. — Vergleich mit einem Adrenalin/Arterenolgemisch *ADR* = 100 γ/kg Adrenalin; *A* = Fraktion A; *B* = Fraktion B; *ADR/ART* = 75 γ/kg Adrenalin + 25 γ/kg dl-Arterenol.

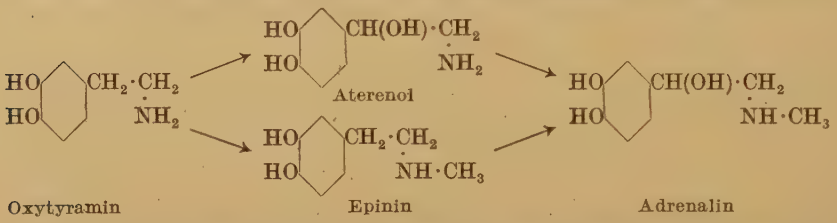
mit dem *höheren* VAN SLYKE-Stickstoff- und Arterenolgehalt — 2,6 bzw. 31,5% — ist etwas *weniger wirksam* als ein Adrenalin-Arterenolgemisch mit 25% Arterenol.

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen.

Die Untersuchungen mit *kristallisierten Hormongemischen* aus Nebennieren sprechen wie unsere früheren Versuche mit *Nebennierenextrakten* dafür, daß im Nebennierenmark außer *Adrenalin* zu ungefähr 25% *Arterenol* vorhanden ist. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit von P. HOLTZ und H. J. SCHÜMANN[1] über „Karotissinusentlastung und Nebennieren" wurde gezeigt, daß die im Gefolge einer Druckentlastung des Karotissinus durch Abklemmen der beiden Karotiden zustandekommende *Hormonausschüttung* aus den Nebennieren nicht aus *Adrenalin* bestehen kann, sondern wahrscheinlich eine Abgabe hormonalen *Arterenols* ans Blut darstellt. *Arterenol*

würde damit zu einem selbständigen und adrenalinunabhängig ausschüttbaren *hormonalen Faktor*, zu einem *neuen Hormon des Nebennierenmarks*.

1. In kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von P. HOLTZ und G. KRONEBERG[4] ist die Auffassung begründet worden, daß die physiologisch wichtigste *Muttersubstanz*, die den Nebennieren für die Adrenalinsynthese angeboten wird, *Oxytyramin* ist. Für die Adrenalinbildung aus Oxytyramin sind 2 Wege diskutierbar, von denen der eine über *Arterenol*, der andere über *Epinin* als Zwischenstation verlaufen würde.



Der *Hormoncharakter* des Arterenols, seine dem Adrenalin an die Seite zu stellende *„biologische Wertigkeit"* und sein *gehäuftes Vorkommen* im Inkretorgan wären zwar nicht unvereinbar mit der Funktion eines *Intermediärproduktes* der Adrenalinbildung, ließen es andererseits aber als möglich erscheinen, daß wie Adrenalin, so auch Arterenol *Endprodukt* und *Endziel* einer spezifischen Biosynthese darstellt. Nicht Arterenol, sondern *Epinin* würde dann die letzte Adrenalinvorstufe sein.

Diese Vorstellung vom Mechanismus der Adrenalinsynthese wäre geeignet, zur Aufhellung der bisher noch nicht geklärten Beziehungen zwischen *Adrenalin-* und *Pigmentbildung* bei der ADDISONschen Erkrankung beizutragen. Nach neueren Untersuchungen DANNEELS[11] über „Tyraminderivate als Pigmentvorstufen" kommt von den als Adrenalinvorstufe in Betracht zu ziehenden Substanzen außer *Oxytyramin* nur dem *Epinin* *„Chromogennatur"* zu, d. h. die Fähigkeit, unter dem Einfluß von Licht und Hautfermenten *Melanin* zu bilden. Man hätte sich vorzustellen, daß beim Morbus Addison die Adrenalinsynthese auf der Stufe des Epinins zum Stillstand käme, die erkrankte Nebenniere nicht mehr zur fermentativen Umwandlung von Epinin in Adrenalin fähig wäre, so daß das *„Chromogen" Epinin — physiologisch* nur kurzlebiges Intermediärprodukt — jetzt ans *Blut* abgegeben würde und in der *Haut* der Melaninbildung, der Bildung des ADDISON-Pigmentes anheim fiele.

2. Wie wir in einer früheren Arbeit näher ausgeführt haben[10], dürfte die wichtigste *physiologische Funktion* des Nebennieren-Arterenols darin bestehen, in Form einer *unterschwelligen Dauer- oder Ruhesekretion* aus dem Nebennierenmark auf dem Blutwege den in der Peripherie,

im Bereich sympathischer Nervenendigungen einem dauernden Verbrauch unterliegenden „*Sympathikusstoff*", der nach neueren Untersuchungen von U. S. v. EULER[12] mit *Arterenol* identisch zu sein scheint, zu ergänzen.

Bis auf die blutdrucksteigernde Wirkung sind alle anderen *pharmakologischen* Wirkungen des *Arterenols* schwächer ausgebildet als beim *Adrenalin*, so z. B. die *Hemmungswirkung* auf glattmuskelige Organe, die Wirkung auf den *Kohlenhydratstoffwechsel* und, wie aus noch nicht veröffentlichten Versuchen hervorzugehen scheint, auch die *Herzwirkung* des Adrenalins, ferner — wie noch nicht abgeschlossene Untersuchungen von G. KRONEBERG[13] an unserem Institut schon jetzt erkennen lassen, die für Adrenalin charakteristische *oxydationssteigernde*, den *Grundumsatz* erhöhende Wirkung. Es erscheint *zweckmäßig*, daß der Organismus sich da, wo es lediglich auf die Ausübung *örtlich begrenzter*, *regulatorischer* Wirkungen im Bereich der Endverästelungen sympathischer — „*arterenergischer*"[14] — Nerven im Erfolgsorgan ankommt, nicht des „großen Systemstoffs" *Adrenalin* bedient, der, wenn er zur Ausübung von „Notfallsfunktionen" im Sinne CANNONS zur Ausschüttung gelangt, auf dem Blutwege sozusagen mit einem Schlage das gesamte sympathische System zu generalisierter Höchstleistung aufstachelt, sondern des „kleinen Spezialisten" *Arterenol*, bei dem bis auf die Kreislaufwirkung alle anderen Wirkungen schwächer als beim Adrenalin entwickelt sind, damit er „*unterwegs*", d. h. auf seinem Wege von den in Dauersekretion befindlichen *Nebennieren* zu den *Nerven* keine unerwünschten, weil unnötigen „hämatogenen" oder „Allgemeinwirkungen" ausübt.

Zusammenfassung.

1. Ein aus Rindernebennieren gewonnenes kristallinisches „*Rohadrenalin*" war am *Katzenblutdruck* wirksamer, am *Kaninchenblutdruck* weniger wirksam als reines *Adrenalin* in gewichtsgleicher Dosierung. *Arterenol* hat im Gegensatz zu anderen adrenalinähnlichen Aminen bei der *Katze* eine stärkere pressorische Wirkung als Adrenalin. Beim *Kaninchen* ist es 5mal weniger blutdruckwirksam.

2. Die durch *Yohimbin* verursachte Umkehr der blutdruck*steigernden* in eine blutdruck*senkende* Wirkung ist bei den Hormonkristallisaten schwächer ausgeprägt als bei reinem Adrenalin. Sie entspricht derjenigen, die man bei Adrenalin-Arterenolgemischen beobachtet.

3. Am Katzenblutdruck gegen Adrenalin ausgewertete Lösungen des Hormonkristallisates waren in Blutzuckerversuchen an Kaninchen weniger *glykämisch* wirksam als blutdruckäquivalente Adrenalinmengen. Ihre Wirkung entsprach derjenigen von Adrenalin-Arterenolgemischen, die 25% Arterenol enthielten.

4. Auch die nach van Slyke ermittelten *Aminostickstoffwerte* sprechen dafür, daß das Hormonkristallisat zu 25—30% aus *Arterenol* besteht.

5. Aus den Versuchsergebnissen wird geschlossen, daß das Nebennierenmark neben *Adrenalin* zu 25—30% *Arterenol* enthält. Auf Grund früherer Untersuchungen über die während einer Karotissinusentlastung erfolgende Ausschüttung von Arterenol aus den Nebennieren wird die Auffassung begründet, daß *Arterenol* ein *selbständiges, neues Hormon* des Nebennierenmarks ist.

6. Die *Funktion* und *physiologische Bedeutung* des neuen Markhormons wird erörtert.

Literatur.

[1] Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 475 (1949). — [2] Schümann, H. J.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 164 (1949). — [3] Holtz, P. u. H. J. Schümann: Naturw. **1948**, 159. Klin. Wschr. **1948**, 605. — [4] Holtz, P. u. G. Kroneberg: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 150 (1949). — [5] Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942). — Hoppe-Seylers Z. **280**, 9 (1943). — [6] Holtz, P. u. K. Credner: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 356 (1942). — [7] Holtz, P. u. H. J. Schümann, W. Langenbeck u. H. Le Blanc: Naturw. **1948**, 191. Siehe auch P. Holtz: Arterenol im Nebennierenmark. Vortrag, gehalten auf der Tagung der ostdeutschen Chemiedozenten in Rostock, 15.—17. Juli 1948. — [8] Abel, J. J.: Ber. chem. Ges. **36**, 1839 (1903). — [9] Holtz, P., K. Credner u. G. Kroneberg: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 228 (1944/47). [10] Holtz, P. u. H. J. Schümann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **206**, 49 (1948). — [11] Danneel, R.: Z. Naturforsch. **1**, 87 (1946). — [12] Euler, U. S. v.: Acta physiol. skand. **11**, 168 (1946); **12**, 73 (1946); **13**, 1 (1946). — [13] Kroneberg, G. u. H. G. Rönicke: Klin. Wschr. (im Druck). — [14] Holtz, P.: Klin. Wschr. **1949**, 64.

Aus dem Pathologischen Institut (Ludwig Aschoff-Haus)
der Universität Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. F. Büchner).

Untersuchungen zur Frage der chronischen Sauerstoffvergiftung.

Von

J. Pichotka und H. A. Kühn.

(Eingegangen am 1. April 1948.)

In neueren Untersuchungen über die Wirkung des Sauerstoffes bei Anwendung hohen Sauerstoffüberdruckes (3,5—5,8 ata) sowie bei erhöhtem Sauerstoffteildruck bei normalem Gesamtdruck haben wir versucht, einen Einblick in die bei der Sauerstoffvergiftung des Warmblüters wirksamen Mechanismen zu gewinnen. Wir waren dabei zu dem Ergebnis gekommen, daß alle in der Lunge bei Sauerstoffvergiftung auftretenden Veränderungen Folge einer primären Kapillarschädigung sind (Kühn und Pichotka). Weiterhin konnten wir nachweisen, daß die Sauerstoffvergiftung bei normalem Gesamtdruck ein zweiphasiger Vorgang ist und in eine primäre hyperoxämische und eine sekundäre hypoxämische Phase zerfällt (Pichotka und Kühn). Nachdem so in einigen grundsätzlichen Fragen der Sauerstoffvergiftung eine Klärung herbeigeführt werden konnte, erschien es notwendig, die praktisch übliche Anwendung der Sauerstoffatmung auf ihre Schädigungsmöglichkeiten hin zu prüfen. In der Praxis wird die Atmung hochkonzentrierter Sauerstoffgemische im allgemeinen nur für eine nach Stunden befristete Zeit angewandt, häufig, wie z. B. in der Luftfahrt oder bei therapeutischer Anwendung, in vielmaliger Wiederholung. Es ergibt sich somit die Frage, ob die gehäufte kurzfristige Atmung konzentrierten Sauerstoffes, die im Einzelfall ohne erkennbare Wirkung bleibt, im ganzen nicht doch zu einer Schädigung führen kann, d. h. ob die Möglichkeit einer *Kumulation* der Sauerstoffwirkung besteht.

Zur Klärung dieser Frage stellten wir zwei verschiedene Versuchsreihen an. In der ersten Reihe (C) wurden Meerschweinchen innerhalb von 5 Monaten mit geringen Unterbrechungen (132 Versuchstage) täglich 4 Stunden lang in einer konzentrierten Sauerstoffatmosphäre gehalten, in der zweiten (E) innerhalb von $4^1/_2$ Monaten (90 Versuchstage) täglich 8 Stunden unter den gleichen Bedingungen.

1. Versuchsreihe C.

Vier noch nicht voll ausgewachsene Meerschweinchen wurden an 132 Versuchstagen innerhalb eines Zeitraumes von 5 Monaten täglich 4 Stunden lang in konzentrierter Sauerstoffatmosphäre bei normalem Gesamtdruck gehalten.

Die Versuchsanordnung entsprach dabei in allem der in früheren Arbeiten beschriebenen (Pichotka, Pichotka und Kühn).

Sauerstoffkonzentration durchschnittlich 95%. Kohlensäurekonzentration bei Beendigung des täglichen 4stündigen Versuches im allgemeinen um 2,5%, einmal bis 3,8%, einmal bis 4,8%. Temperatur des Versuchsraumes zwischen 20 und 25° C.

Anfangsgewichte:

Tier 1: 260 g,
Tier 2: 245 g,
Tier 3: 235 g,
Tier 4: 240 g.

Gewichte nach Beendigung des Versuches:

Tier 1: 570 g,
Tier 2: 550 g,
Tier 3: 640 g,
Tier 4: 620 g.

Bei allen Tieren also normale Gewichtszunahme.

Das allgemeine Verhalten der Tiere war nach 132 Versuchstagen unverändert. Die Atmung war jeweils gegen Ende des 4stündigen Versuches vertieft und beschleunigt, in diesem Verhalten war nach 132 Tagen keine Veränderung eingetreten. Die anfänglich im Normalbereich liegenden Atemfrequenzen *außerhalb* der Kammer stiegen vor allem in den ersten Versuchswochen erheblich an. Diese Steigerung war unregelmäßig, erreichte aber nicht selten 30—40% des Ausgangswertes, und liegt damit sicher außerhalb der Fehlergrenze. Gegen Ende der Versuchszeit war sie nicht mehr so ausgeprägt. Auffällig ist die Beobachtung, daß die erhöhten Atemfrequenzen zu Beginn der täglichen Sauerstoffatmung oft sehr schnell und bei allen Tieren gleichmäßig in den unteren Bereich der Norm absank. Die dann im weiteren täglichen Versuchsverlauf wieder einsetzende Erhöhung der Atemfrequenz ging offenbar der Kohlensäurekonzentration in der Kammer parallel, denn sie war durch Vergrößerung des Sauerstoffstromes und damit Verminderung der Kohlensäurekonzentration jederzeit zu beeinflussen. In der ersten Versuchszeit wurden während des Aufenthaltes unter Sauerstoff nicht selten Rhythmusstörungen mit niedrigen Atemfrequenzen beobachtet (40—60 gegen normal 70—100), die im späteren Verlauf nicht mehr auftraten. Die Müdigkeitssymptome wie Gähnen, Strecken der Hinterbeine und Hinlegen der Tiere konnten durch Erniedrigung des Kohlensäuregehaltes in der Kammer zum Schwinden gebracht werden. Besonders zu erwähnen ist die Beobachtung, daß die Tiere wenige Minuten nach Einschalten des Sauerstoffstromes regelmäßig sehr lebhaft wurden, um im weiteren Verlauf des täglichen Versuches immer bewegungsärmer zu werden.

Auffallend war der gute Ernährungszustand der Tiere und ihr besonders glattes und glänzendes Fell, womit sie sich deutlich von anderen sonst unter gleichen Bedingungen gehaltenen Stalltieren unterschieden.

Die Tötung der Tiere in dieser Versuchsreihe erfolgte durch Dekapitation. Drei Tiere wurden unmittelbar nach Abbruch des Versuches getötet (C 1, C 3, C 4), ein Tier (C 2) wurde erst 6 Monate später getötet, nachdem es in der Zwischenzeit wieder unter normalen Stallverhältnissen gehalten worden war.

Die Organe der Versuchstiere wurden in Formol, außerdem nach Carnoy, Susa und Buoin fixiert. Von allen Organen wurden mehrere Stücke untersucht. Die Lungenschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin, außerdem nach van Gieson und Weigert, sowie mit der Azanmethode gefärbt, die Lebern und Nieren mit Hämatoxylin-Eosin und Hämatoxylin-Sudan.

Anatomische und histologische Befunde.

Die Befunde bei den Tieren dieser Versuchsreihe sind so einheitlich, daß sie in Zusammenfassung wiedergegeben werden können.

Sektionsbefund Tier C 1, 3 und 4. Lungen zurückgesunken, Pleurahöhlen ohne Inhalt, Pleuren glatt und spiegelnd. Lungenoberfläche gelbrot gefleckt, Schnittfläche ziemlich trocken. An den übrigen Organen normaler Befund.

Histologischer Befund. Lunge: Mäßige Entfaltung der Alveolen, zum Teil Atelektasen und geblähte Bezirke nebeneinander. Kein Exsudat, keine Veränderungen der Alveolarsepten. Nur in der Lichtung der Bronchien und Bronchiolen hier und da feinkörniges Exsudat. In den Nischenzellen zum Teil feinkörniges braunes Pigment, das sich bei der TURNBULL-Färbung blau anfärbt. Lymphatische Strukturen auffallend reichlich ausgebildet. Bei 2 Tieren in atelektatischen Bezirken riesenzellartige Wucherungen der Alveolarepithelien. Vereinzelt bei C 4 polsterartige Wucherungen der Intima kleiner Arterien. Kapillaren in den meisten Abschnitten der untersuchten Präparate stark gefüllt, sonst o. B.

Herz und Niere. Keine pathologischen Veränderungen.

Leber. Bei allen 3 Tieren normale Glykogenspeicherung. Bei C 4 ganz geringe zentrale Verfettung. Sonst keine Besonderheiten.

Das Tier C 2, das 6 Monate nach Beendigung des Versuches getötet wurde, hatte nach dieser Zeit erheblich an Gewicht abgenommen. Während es im Verlauf des Versuches immer das stärkste Tier gewesen war, wog es bei der Tötung 50 g weniger als der Durchschnitt der anderen Tiere dieser Reihe.

Sektionsbefund Tier C 2. Die Lungen sinken nach Eröffnung des Brustkorbes vollständig zurück, Oberfläche von gelblichroter Farbe. Oberfläche der Pleura an einigen Stellen verdickt aber glatt. Im Bereich des linken Unterlappens einige strangförmige Verwachsungen zwischen Lunge und Brustwand. In der rechten Pleurahöhle einige Tropfen klarer Flüssigkeit. Herz blutgefüllt, übrige Organe o. B.

Histologischer Befund. Lunge: Stellenweise emphysematöse Erweiterung der Alveolen, an anderen Stellen umschriebene Atelektasen. Epithel der Bronchien und Bronchiolen unverändert, in ihrer Lichtung stellenweise feinkörniger eosingefärbter Inhalt mit zelligen Elementen, vor allem abgestoßenen Epithelien, Rundzellen und vereinzelten Leukozyten untermischt. In den Nischenzellen vereinzelt feinkörniges braunes Pigment, das schwach die Eisenreaktion gibt. In den Alveolen kein Exsudat. An einigen Stellen drüsenartige Wucherungen des Bronchialepithels, hier und da auch riesenzellartige Wucherungen der Alveolarepithelien wie bei den anderen Tieren dieser Reihe. Kapillaren zum größten Teil stark blutgefüllt, ihre Wandungen zum Teil deutlich verdickt. Perivaskuläres Gewebe ödematös aufgelockert, Lymphspalten erweitert. Pleura an einigen Stellen bindegewebig verdickt, an anderen Stellen mit frischen Fibrinbelägen bedeckt.

Herz, Nieren und Leber. Kein pathologischer Befund.

2. Versuchsreihe E.

Vier noch nicht voll ausgewachsene Meerschweinchen wurden an 90 Versuchstagen innerhalb von $4^1/_2$ Monaten täglich 8 Stunden in konzentrierte Sauerstoffatmosphäre bei normalem Gesamtdruck versetzt. Sauerstoffkonzentration um 95%, Kohlensäurekonzentration einmal bis 5%, sonst wie in der vorigen Versuchsreihe.

Anfangsgewichte:

Tier 1: 425 g,
Tier 2: 460 g,
Tier 3: 425 g,
Tier 4: 375 g.

Gewicht nach Beendigung des Versuches nach 90 Tagen:

Tier 1: 675 g,
Tier 2: 490 g,
Tier 3: 580 g,
Tier 4: 690 g,

also bei allen Tieren, mit Ausnahme von Tier 2 normale Gewichtszunahme. Das allgemeine Verhalten und das Verhalten der Atmung war das gleiche wie bei den Tieren der Versuchsreihe C. Auch diese Tiere kamen im Verlaufe des Versuches in einen guten Futterzustand und hatten ein auffallend dichtes und glänzendes Fell, das von dem unbehandelter Stalltiere deutlich abstach. Die Steigerung der Atemfrequenz außerhalb des täglichen Versuches an der Außenluft war bei diesen Tieren in den ersten Versuchswochen besonders deutlich.

Anatomische und histologische Befunde.

Zwei Tage nach dem 90. Versuchstag wurden die Tiere E 1 und E 2 durch Nackenschlag, E 4 durch Dekapitation getötet. Bei der geringen Differenz der Befunde kann auch bei dieser Versuchsgruppe der Sektions- und histologische Befund zusammengefaßt wiedergegeben werden.

Sektionsbefund der Tiere E 1, 2 und 4. Pleurahöhlen ohne Inhalt, Lungen etwas gebläht, sinken bei der Eröffnung des Brustkorbes nicht ganz zurück und knistern beim Drücken. Oberfläche glatt, rotfleckig gezeichnet. Auch auf dem Schnitt eine rötliche Fleckung. Nur wenig Flüssigkeit abzudrücken. Übrige Organe ohne pathologische Veränderungen.

Histologische Befunde. Lunge: Alveolen in den Randgebieten stark erweitert, in den zentralen Abschnitten dagegen normal entfaltet. Gefäße und Kapillaren hochgradig mit Blut gefüllt. Auch in größeren Bronchien zum Teil Blut, zum Teil seröses Exsudat. Alveolarsepten nicht verändert. Epithel der Bronchioli respiratorisch ohne pathologische Veränderungen. In den Alveolen kein Exsudat, dagegen in einigen Abschnitten abgeschilferte Alveolardeckzellen. In der Wand der mittleren und großen Bronchien ziemlich reichlich eosinophile Leukozyten. In den Alveolarepithelien stellenweise ein feinkörniges braunes Pigment, das zum Teil die Eisenreaktion gibt. Lymphatische Strukturen ziemlich stark ausgebildet.

Leber. Glykogenarmut, trübe Schwellung der Leberzellen. Mäßige bis ausgedehnte fast ausschließlich in der Läppchenperipherie lokalisierte Vakuolisierung des Protoplasmas der Epithelien. Vereinzelt reichen solche vakuolisierten Leberzellen in Straßen bis an die Zentralvene. Im Zentrum hier und da wolkige Aufhellung des Protoplasmas der Epithelien. In der Läppchenperipherie zum Teil auffallend blasse Leberzellen mit Bildern karyolytischen Kernunterganges, daneben dunkle basophile Leberepithelien von zipflig ausgezogener Form. Vereinzelt Phagozytose einzelner nekrotischer Leberzellen durch gelapptkernige Leukozyten, zum Teil sind diese von Leukozyten umlagerten Leberzellen auch noch auffallend gut erhalten. In der Umgebung des peripheren Gefäßbündels stellenweise geringe Fibroblastenwucherungen.

Herz und Nieren. Ohne pathologischen Befund.

Das Tier *E 3* wurde $2^1/_2$ Monate nach Beendigung des Versuches durch Dekapitation getötet, nachdem es in der Zwischenzeit keine krankhaften Erscheinungen gezeigt hatte.

Sektionsbefund. Pleurahöhlen ohne Inhalt. Lungen zurückgesunken. Oberfläche glatt und spiegelnd. In beiden Unterlappen einige punktförmige Blutungen unter der Pleura und auf der Schnittfläche. An den übrigen Organen kein pathologischer Befund.

Histologischer Befund. Lunge: Stellenweise reichlich Blut in den stark geblähten Alveolen und den Bronchien. In den Alveolarsepten ziemlich reichlich gelapptkernige Leukozyten. Sonst, besonders an den Alveolarwänden und den Wandungen der Alveolargänge und Bronchioli respiratorisch kein krankhafter Befund.

Leber. Glykogenarmut und trübe Schwellung der Leberzellen. Mäßige bis starke grobe Vakuolisierung der Leberepithelien von der Peripherie ausgehend und manchmal bis in die Nähe der Zentralvene reichend. In der äußersten Läppchenperipherie an einigen Stellen auch mitteltropfige Verfettung der Leberzellen. In einigen fettfreien Vakuolen eosinrote Einschlüsse. In der Läppchenperipherie außerdem zahlreiche verblassende Leberzellen und Bilder von Phagozytose einzelner Leberzellen durch gelapptkernige Leukozyten.

Herz und Nieren. Kein pathologischer Befund.

Besprechung der Befunde.

Das allgemeine Verhalten der Tiere in diesen beiden Versuchsreihen war nicht besonders auffallend. Lediglich die Atmung veränderte sich im Verlaufe der täglichen Sauerstoffatmung wie auch im Verlaufe des Gesamtversuches, wobei allerdings zu bemerken ist, daß wir nur die Atem*frequenz* beobachten konnten, die nur einen ungefähren Rückschluß auf die Respirationsgröße zuläßt. Drei verschiedene Formen von Änderung der Atemfrequenz ließen sich deutlich voneinander abgrenzen:

1. Zu Beginn der täglichen Sauerstoffatmung kam es, unabhängig von der Zahl der Versuchstage, zu einer deutlichen Erhöhung der Atemfrequenz, die schnell wieder abklang, mit jeder weiteren Erhöhung des Sauerstoffteildruckes aber wieder hervorgerufen werden konnte. Diese Veränderung der Atmung findet ihre Erklärung durch die Erhöhung der Kohlensäurespannung des Blutes, die durch die Erhöhung der alveolären Sauerstoffspannung ebenso wie durch die Steigerung der alveolären Kohlensäurespannung erreicht werden kann (Campbell, Becker-Freyseng und Pichotka).

2. Gegen Ende des täglichen Aufenthaltes in der Kammer wurde mit Regelmäßigkeit eine Beschleunigung und Vertiefung der Atmung beobachtet. Diese Atmungssteigerung erklärt sich, ebenso wie die gleichzeitig auftretenden Müdigkeitssymptome wie Gähnen und Hinlegen, durch die gegen Ende des Versuches ansteigende Kohlensäurekonzentration in der Kammer, die wegen Fehlens einer Kreislauflüftung nicht zu vermeiden war.

3. Schließlich wurde auch *außerhalb der Kammer* eine langsame Steigerung der Atemfrequenz im Verlaufe des Gesamtversuches beobachtet, die in der 6. Versuchswoche am stärksten ausgeprägt war.

Dabei ist bemerkenswert, daß bei den Tieren, die diese Frequenzsteigerung an Außenluft am eindrucksvollsten zeigten, die Atmung bei Beginn des täglichen Versuches unmittelbar nach dem Einschalten des Sauerstoffstromes zuerst absank, um dann erst langsam wieder anzusteigen. Wie diese Veränderung der Atemfrequenz zustande kommt, konnten wir nicht feststellen. Lungenveränderungen liegen ihr nach dem Ergebnis der histologischen Untersuchung nicht zugrunde. Im übrigen verdient noch einmal betont zu werden, daß die Tiere offenbar keinen schwereren Schaden durch den Versuch gelitten hatten, was durch die normale Gewichtszunahme bewiesen wird.

Bei der Besprechung der *morphologischen Befunde* wäre für beide Versuchsreihen die Tatsache voranzustellen, daß keine histologischen Veränderungen an den Lungen zu finden waren, welche als Ursache einer Pneumonose gelten könnten, obwohl die Gesamtversuchszeit das Vielfache der Zeit beträgt, die bei ununterbrochenem Verweilen in der verwendeten Sauerstoffatmosphäre zum sicheren Tod durch eine Diffusionsbehinderung in der Lunge geführt hätte. Die Lungenveränderungen erschöpfen sich in einer Hyperplasie der lymphatischen Strukturen, einer Anhäufung von eosinophilen Leukozyten, geringem dünnflüssigem Ödem mit desquamierten Epithelien und Leukozyten in den Bronchien, Pigmentspeicherung der Alveolardeckzellen, sowie geringfügigen Veränderungen kleiner Arterienäste durch polsterartige Verdickung der Intima. Hin und wieder fanden sich drüsenartige Wucherungen des Bronchialepithels. Eines der überlebenden Tiere (C II) zeigte eine eitrige Bronchitis und neben älteren Pleuraveränderungen eine frische fibrinöse Pleuritis.

Für die Beurteilung dieser Bilder, insbesondere ihres Zusammenhanges mit unserer Versuchsanordnung, ist zu berücksichtigen, daß sie alle — mit Ausnahme der Arterienveränderungen — auch bei unbehandelten Meerschweinchen hin und wieder beobachtet werden, wie wir uns durch Untersuchung zahlreicher unter normalen Stallbedingungen gehaltener Vergleichstiere überzeugen konnten. Derartige Veränderungen können lediglich als Ausdruck eines allgemeinen unspezifischen Reizzustandes des Lungenparenchyms gelten. Das trifft besonders auch auf die lymphatischen Strukturen in der Meerschweinchenlunge zu, die bei unseren Versuchstieren im allgemeinen wesentlich stärker entwickelt waren als bei den Kontrolltieren. Als auslösender Faktor für diese Hyperplasie der Lymphknötchen kann die veränderte Zusammensetzung der Atemluft, ebenso aber die veränderte Temperatur oder Feuchtigkeit des Versuchsraumes in Frage kommen.

Eine wesentliche Differenz zwischen den Befunden der C- und der E-Reihe war bei allen diesen Befunden nicht festzustellen.

Ob die bei einigen Tieren der beiden Versuchsreihen beobachteten polsterartigen Verdickungen der Intima kleiner Arterien der Lunge als pathologischer, insbesondere kausal mit unseren Versuchsbedingungen zusammenhängender Befund zu werten sind, ist nicht mit Sicherheit zu entscheiden. Nach den Erfahrungen von Smith und Mitarbeitern und Rehbock und Mitarbeitern ist es durchaus denkbar, daß sich derartige Gefäßwandveränderungen auch unter unseren Versuchsbedingungen entwickelten, zumal wir bei unseren unbehandelten Vergleichstieren derartige Bilder nicht gesehen haben.

Diese Autoren beobachteten bei Ratten, die 2 Wochen und länger in 83,6%iger Sauerstoffatmosphäre gehalten waren, Verdickung und Hyalinisierung der Wände kleiner Arterien und thrombotischen Verschluß ihrer Lichtung. Vom 45. Tag ab konnten sie auch Mediaveränderungen an größeren Arterien nachweisen.

Von französischen Autoren (Binet und Bochet, Héderer und André) wurde bei experimenteller Sauerstoffvergiftung mehrfach eine Verdickung der Alveolarbalken beschrieben. Auch wir hatten hin und wieder diesen Eindruck, doch ist es sehr schwer, einen solchen Befund tatsächlich exakt festzulegen, denn die Stärke der Alveolarwand ist eine Funktion des Entfaltungszustandes, und es müssen immer daher Stärke der Alveolarwand und Entfaltung der Alveolen nebeneinander beurteilt werden. Das schien uns bei den starken Differenzen im Entfaltungszustand aber undurchführbar.

Die bei dem überlebenden Tier der Versuchsreihe C nach 2 Monaten gefundenen Veränderungen im Sinne einer Bronchitis und fibrinösen Pleuritis legen Beziehungen zu den Beobachtungen von Rehbock und Mitarbeitern sowie Giginow und Gironkine nahe.

Sind somit die Lungenveränderungen nicht sehr charakteristisch, so gestaltet sich das Bild bei den *Leberbefunden* anders. In der C-Reihe haben wir unveränderte Lebern mit normalem Glykogengehalt, in der E-Reihe finden sich dagegen bei allen Tieren deutliche und kennzeichnende Veränderungen. Die beiden Versuchsreihen liefen unter den gleichen Bedingungen nebeneinander her, außer den verschiedenen täglichen Versuchszeiten ist keine Ursache aufzufinden, die den Unterschied der Leberveränderungen bei den beiden Reihen erklären könnte. Die für die Leber schädliche Grenze scheint also zwischen den beiden angewandten Belastungsgrößen zu liegen. Das gilt umso mehr, als die Belastung, die nicht zur Leberschädigung führte (täglich 4 Stunden Sauerstoffatmung an 132 Versuchstagen) für eine erheblich längere Gesamtversuchszeit angewandt wurde als die Belastung, welche Veränderungen im histologischen Bild der Leber hervorbrachte. Die bei der Versuchsreihe E vorkommenden Formen der Leberveränderungen bestehen in peripherer Vakuolisierung und Verfettung der Leberepithelien, in ebenfalls läppchenperipher gelegenen Zelluntergängen und Fibroblastenwucherungen, im Auftreten basophiler Zellen und Phagozytose meist einzelner Leberzellen durch Leukozyten. Während die Zelluntergänge und die Fibroblastenwucherungen sich an die peripheren Gefäßbündel und die großen Gefäße anlehnen, bestehen für die basophilen Zellen und die Phagozytosen nicht so einfache Beziehungen. Die basophilen Zellen finden sich zwar gehäuft um die periportalen Felder oder um größeren Pfortader- oder Arterienäste, die Verteilung außerhalb dieser Schwerpunkte läßt aber keine einfache Ordnung mehr erkennen. Sie liegen manchmal mit einer gewissen Gleichmäßigkeit ausgesät, manchmal mehr in zugförmiger Anordnung, manchmal regellos im Läppchen verteilt und zeichnen sich durch Basophilie, Dichte des Plasmas, unregelmäßig lang ausgezogene zipflige Form mit radiär gestelltem Hauptdurchmesser und Kernverdichtung bis zur Pyknose aus. Diese Veränderungen nehmen gegen die Läppchenperipherie hin zu.

Durch ihre Kernveränderungen unterscheiden sich diese basophilen Zellen von den „dunklen Grenzzellen" Pfuhls und Claras. Im übrigen haben wir derartige dunkle Zellen bei unbehandelten Kontrolltieren niemals nachweisen können.

Die Phagozytosen von Leberzellen durch Leukozyten folgen in ihrer Lokalisation im Läppchen offenbar ähnlichen Gesetzen wie die basophilen Zellen, obwohl es bei ihrer geringeren Häufigkeit schwer ist, derartige Gesetzmäßigkeiten herauszuschälen. Was bei beiden Veränderungen im histologischen Bild besonders auffällt, ist die Tatsache, daß jeweils nur einzelne Zellen, seltener kleine Gruppen befallen werden, die in einer ganz unveränderten Umgebung liegen. Dieses Verhalten ist wohl nur mit intrazellulären Faktoren zu erklären, vielleicht mit Verschiedenheiten im Funktionszustand der einzelnen Zellen.

An eine Beziehung zwischen der Phagozytose von Leberzellen und dem Auftreten basophiler Epithelien, ist bei der Parallelität ihres Auftretens und der gleichen räumlichen Anordnung zu denken. Die Phagozytose könnte der Beseitigung der basophilen Zellen dienen, die offenbar schwer geschädigt sind. Nicht selten finden sich aber Bilder der beginnenden Phagozytose, in denen die befallene Leberzelle in allen Einzelheiten noch deutlich erkennbar ist und sich kaum von einer normalen Zelle unterscheidet. Warum es hier zu einer Phagozytose durch Leukozyten kommt, ist nach dem morphologischen Bild nicht zu entscheiden.

Erstaunlich ist die Beobachtung, daß diese Leberveränderungen sich auch noch bei einem Tier finden, das erst $2^1/_2$ Monate nach Versuchsende getötet wurde. Da kein anderer Grund für ihre Entstehung einsichtig ist, und wir bei keinem Kontrolltier derartige Veränderungen gefunden haben, müssen wir annehmen, daß diese Veränderungen, insbesondere die Vakuolen, lange Zeit bestehen bleiben können, eine Beobachtung, die in jüngster Zeit auch Altmann bei durch Unterdruck hervorgerufenen Vakuolen in Leberzellen gemacht hat. Damit verlieren die Vakuolen den harmlosen Charakter, der ihnen wegen ihrer schnellen Rückbildungsfähigkeit unter anderen Versuchsbedingungen zunächst zugesprochen werden mußte (Pichotka). Bei diesem überlebenden Tier fanden sich auch zahlreiche Einschlußkörperchen in den Vakuolen, wie sie ebenfalls von Altmann bei schwerem Sauerstoffmangel beschrieben wurden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Leberveränderungen, insbesondere die Vakuolisierung und Verfettung der Leberepithelien in der Läppchenperipherie, dem entsprechen, was wir in einer früheren Arbeit als charakteristisch für die Wirkung der Hyperoxämie in der Leber angesprochen haben (Pichotka und Kühn). Die über Monate fortgesetzte täglich 8stündige Sauerstoffatmung scheint also bei Meerschweinchen doch zu einer Schädigung zu führen, die bemerkens-

werterweise nicht an den Lungen, sondern an der Leber ihren morphologischen Ausdruck findet. Wie weit diese Beobachtungen für die Anwendung des Sauerstoffes beim Menschen von Bedeutung sind, möge dahingestellt bleiben. Bei der wesentlich höheren Sauerstofftoleranz des Menschen gegenüber der des kleinen Laboratoriumversuchstieres (Clamann und Becker-Freyseng) sind wahrscheinlich noch erheblich längere Einwirkungszeiten nötig, um derartige Schädigungen hervorzurufen. Immerhin muß mit der grundsätzlichen Möglichkeit einer Leberschädigung bei langdauernder fraktionierter Sauerstoffatmung gerechnet werden.

Wenn wir auf unsere Ausgangsfragestellung zurückkommen, so ist nach dem Ergebnis unserer Versuche festzustellen, daß eine Summation der Sauerstoffwirkung unter unseren Versuchsbedingungen nicht in Erscheinung trat. Alle Versuchstiere ertrugen bei fraktionierter Belastung ohne wesentliche Beeinträchtigung ihres Allgemeinzustandes das Mehr- bis Vielfache einer Zeit unter hoher Sauerstoffspannung, die bei ununterbrochenem Aufenthalt zum Tode geführt hätte. Die Verträglichkeit scheint dabei umso größer zu sein, je kürzer die einzelne Belastung ist. Mit dieser Feststellung ist aber nicht gesagt, daß die langfristige fraktionierte Atmung von hochgespanntem Sauerstoff ohne jede Wirkung sei. Das geht aus der Ausbildung der Leberveränderungen in der Versuchsreihe E eindeutig hervor.

Nicht zu entscheiden ist nach unseren Versuchsbedingungen die Frage, ob eine *Anpassung* der Versuchstiere an erhöhte Sauerstoffspannung der Umgebung möglich ist. Bei Ratten scheint nach den Arbeiten von Smith und Mitarbeitern sowie Soulié eine derartige Anpassung möglich zu sein, für das Meerschweinchen fehlen ähnliche Untersuchungen. Wir selber haben in unveröffentlichten Versuchen, bei denen Meerschweinchen mehrmals bis zum Auftreten schwerer Vergiftungserscheinungen in konzentrierte Sauerstoffatmosphäre versetzt wurden, keinen Anhalt für eine Gewöhnung an erhöhte Sauerstoffspannungen gewinnen können, doch waren diese Versuche wahrscheinlich zu kurzfristig und in ihrer Anlage ungeeignet, um diese Frage beantworten zu können. Versuche dieser Art müßten mit Sauerstoffspannungen beginnen, die außerhalb des toxischen Bereiches liegen und dann langsam ansteigen.

Die Frage der Anpassung an erhöhte Sauerstoffspannung des Lebensraumes ist von großer allgemeinbiologischer Bedeutung. Gewisse Tierarten, z. B. manche Amphibien, besitzen noch die Möglichkeit, sich einer veränderten Sauerstoffspannung der Umgebung weitgehend anzupassen. Diese Fähigkeit beruht auf der Veränderung der gasaustauschenden Flächen, in diesem Falle des Kiemenepithels, das bei erhöhtem Sauerstoffgehalt des Wassers an Dicke und Zellreichtum

zunimmt. Dem Warmblüter scheint diese Anpassungsfähigkeit verlorengegangen zu sein, da merkliche Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration seiner Umwelt nicht vorkommen, es sei denn, man erblickt in den bei der Sauerstoffvergiftung unter Gleichdruck auftretenden Lungenveränderungen, insbesondere den Verdickungen der Kapillarwände (Kühn und Pichotka) einen solchen Regulationsversuch, der dann aber, über das Ziel hinausschießend, schließlich selbst zur Todesursache wird. Mit der Andeutung dieser Möglichkeiten möchten wir uns hier begnügen, nur in speziell darauf gerichteten Untersuchungen wird dieses interessante Problem zu lösen sein.

Zusammenfassung.

1. Der täglich 4stündige Aufenthalt in einer 90—95%igen Sauerstoffatmosphäre führt beim Meerschweinchen auch nach langer Versuchszeit (132 Tagen) weder zu schweren klinischen Erscheinungen noch zu morphologischen Veränderungen an Lunge, Leber, Herzmuskel und Nieren.

2. Mit täglich 8stündiger Sauerstoffatmung unter sonst gleichen Bedingungen lassen sich bei etwas kürzerer Versuchszeit (90 Versuchstage) ebenfalls keine wesentlichen klinischen Vergiftungserscheinungen herbeiführen, doch finden sich bei diesen Tieren charakteristische degenerative und reperative Veränderungen in der Leber, die den in früheren Arbeiten als charakteristisch für die Wirkung der Hyperoxämie an der Leber beschriebenen Bildern ähnlich sind. Veränderungen an den Lungen, wie sie für die Sauerstoffvergiftung bekannt sind, treten dagegen auch bei diesen Tieren nicht auf.

3. Die Bedeutung dieser Befunde für die Sauerstoffatmung beim Menschen sowie die Möglichkeit einer Anpassung an erhöhte Sauerstoffspannung der Atemluft werden kurz erörtert.

Literatur.

Altmann, H. W.: Frankf. Z. Path. **1949**. — Becker-Freyseng, H. u. J. Pichotka: Klin. Wschr. **1944**, 339. — Binet, L. et M. Bochet: Sang **14**, 433 (1941). — Campbell, J. A.: J. Physiol. (Brit.) **68**, 7 (1929/30). — Clamann, H. G. u. H. Becker-Freyseng: Luftf.med. **4**, 1 (1940). — Clara, M.: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **31**, 193 (1932). — Giginow, V. A. et A. G. Gironkine: Fiziol. Ž. **26**, 657 (1939). — Ref. Luftf.med. **4**, 251 (1940). — Héderer, Ch. et L. Andrê: Bull. Acad. Méd. Par. **123**, 294 (1940). — Kühn, H. A. u. J. Pichotka: Arch. exper. Path. (D.) **205**, 667 (1948). — Pfuhl, W.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie, Bd. 5, Teil 2, S. 235. — Pichotka, J.: Beitr. path. Anat. **105**, 381 (1941). — Pichotka, J. u. H. A. Kühn: Arch. exper. Path. (D.) **204**, 336 (1947). — Rehbock, Oldt and Dixon: Arch. Path. (Am.) **30**, 1172 (1940). — Smith, Bennet, Heim, Thomson and Drinker: J. exper. Med. (Am.) **56**, 79 (1932). — Smith, Heim, Thomson and Drinker: J. exper. Med. (Am.) **56**, 63 (1932). — Soulié, P.: C. r. Soc. Biol. **130**, 541 (1939).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol.

III. Mitteilung.

Chronische Vergiftung mit m-Dinitrobenzol.

Von

MANFRED KIESE.

Mit 7 Textabbildungen.

(*Eingegangen am 18. November 1946.*)

Über die Wirkung des m-Dinitrobenzols bei wiederholter Gabe kleiner Dosen liegen systematische experimentelle Untersuchungen nicht vor. Wir haben in Ergänzung der in der I. Mitteilung beschriebene Versuche[1] mit großen Dosen m-Dinitrobenzol solche Untersuchungen an Hunden durchgeführt.

Den Hunden wurde m-Dinitrobenzol zu 1 oder 2% in Olivenöl bzw. Mohnöl gelöst subkutan injiziert. Die angewandten Methoden der Blutuntersuchung sind in der I. Mitteilung[1] bereits erwähnt. Sieben Gruppen von Tieren wurden mit Dosen von 6,0, 2,0, 1,5, 1,0, 0,5, 0,2 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol behandelt. Jedoch wurde nicht immer an der täglichen Injektion festgehalten, sondern bei bedrohlicher Verschlechterung des Zustandes der Tiere wurde die Verabreichung von m-Dinitrobenzol vorübergehend unterbrochen. Zwei Versuche zur Prüfung der Wirksamkeit des m-Dinitrobenzols nach Verabreichung in den Magen werden gesondert kurz beschrieben.

Versuchsergebnisse.

1. Allgemeine Beschreibung des Vergiftungsverlaufs.

Dosen von 6 mg/kg m-Dinitrobenzol lösten bei den Hunden noch akute Wirkungen aus, wie wir schon beschrieben[2]. Sie waren freilich geringer als nach 10 oder gar 20 mg/kg. Wir haben einem Hunde an 2 aufeinanderfolgenden Tagen und nach 4 Tagen nochmal an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, also im ganzen in 9 Tagen 5mal je 6 mg/kg m-Dinitrobenzol injiziert. Er starb nach der fünften Injektion. Am letzten Tage waren Krämpfe aufgetreten. Der Blutfarbstoffgehalt hatte von 17,5 auf 12,5 g/100 ml abgenommen. Der Hämiglobingehalt war auf 5,5 g/100 ml angestiegen. HEINZ-Körper waren an 40% der roten Zellen vorhanden.

[1] KIESE, M.: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 361 (1949). — [2] CAMMERER, A., M. KIESE u. K. TAUSCHWITZ: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 384 (1949).

Nach der Injektion von 2 mg/kg m-Dinitrobenzol waren bereits am nächsten Tage Veränderungen der Tiere bemerkbar. Von 5 Hunden fraß einer gar nicht und 2 nur schlecht. Am fünften Tage nach täglicher Injektion von 2 mg/kg m-Dinitrobenzol fraßen alle Tiere schlecht, 1 Hund war bereits in Seitenlage und hatte einige Krampfanfälle. Am achten Tage starben 2 Tiere, nach 9 Tagen das dritte. Dann wurden die Injektionen abgebrochen. Ein Hund starb noch 14 Tage später und einer überlebte.

Dosen von 1,5 mg/kg m-Dinitrobenzol wurden länger ertragen. Der Ablauf dieser Versuche war der chronischen Vergiftung schon ähnlicher. Nachdem der Zustand der Tiere einige Tage unverändert blieb, wurden sie ruhiger und zeigten bald darauf nervöse Störungen, die meist ein typisches Bild boten. Der Gang der Hunde wurde langsam, steif und unsicher. Während die hintere Körperhälfte auf steifen Hinterbeinen hoch getragen wurde, sank die vordere etwas tiefer, da die steifen Vorderbeine breit nach vorn außen gesetzt wurden. Auf glattem Boden fielen die Hunde sehr häufig. Entweder kippte zunächst das hohe Hinterteil um oder die Tiere rutschten zunächst unter Spreizung der Vorderbeine platt auf die Brust, worauf das Hinterteil umkippte. Schon zu dieser Zeit war die passive Bewegung der Beingelenke erheblich erschwert. Die Injektionen von m-Dinitrobenzol wurden abgebrochen, sobald nervöse Störungen in stärkerem Maße vorhanden waren. Dieser Zustand war in 7—25 Tagen, im Mittel in $14{,}3 \pm 1{,}6$ Tagen erreicht (Tabelle 1). In allen Versuchen nahmen die Störungen noch weiter zu, auch wenn nicht mehr m-Dinitrobenzol verabreicht wurde. Lähmungen, die den Tieren Laufen und Stehen unmöglich machten, und Krämpfe folgten den leichteren nervösen Störungen oft und in kurzem Abstande, so daß vormittags die ersten Unsicherheiten im Laufen beobachtet wurden und nachmittags das Tier bereits in Seitenlage war und Krämpfe hatte. Die Krämpfe waren tonisch-klonischer Art und wurden oft durch geringe äußere Reize ausgelöst, sie gingen meist in Laufbewegungen in Seitenlage über. Einige Tiere machten stundenlang oder gar tagelang mit kurzen Unterbrechungen solche Laufbewegungen. In den Zeiten der größten Krampfbereitschaft lagen die Tiere mit zum Rücken gezogenen Kopf und gestreckten steifen Beinen, bereit, auf den geringsten Reiz in einen Klonus zu verfallen. Sehnenreflexe waren auch in dem späteren Stadium immer auszulösen, wenn keine Krämpfe mehr auftraten. Die Dauer dieses ersten Stadiums der Lähmung mit Krämpfen umfaßte oft nur wenige Tage, wenn die m-Dinitrobenzolverabreichung sofort bei Beginn unterbrochen wurde. Aber bei 2 Hunden von 12 trat bereits einen Tag nach dem ersten Krampfanfall der Tod ein, bei einem weiteren 15 Tage später. Tiere, die längere Zeit in Seitenlage waren, bekamen oft

Dekubitalgeschwüre, die nur langsam heilten. Bei den überlebenden Tieren wurde die Injektion von m-Dinitrobenzol ausgesetzt, sobald stärkere nervöse Störungen oder gar Krämpfe auftraten. Zwei Tiere konnten auf diese Weise 74 Tage, eines sogar 113 Tage im Wechsel zwischen manifesten Störungen und eben ausreichender Erholung für die weitere Vergiftung gehalten werden. Infolge der wiederholten Unterbrechungen der m-Dinitrobenzolverabreichung kann die Dauer bis zum Eintritt des Todes nicht als ein Maß für die Wirkung der chronischen Verabreichung von 1,5 mg/kg m-Dinitrobenzol angesehen werden.

Mit wenigen Ausnahmen verloren die Hunde während der Vergiftung an Gewicht.

Die Vergiftung von 3 Hunden mit Dosen von 1,0 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich bot das gleiche eben beschriebene Bild mit dem Unterschied, daß die Vergiftung etwas langsamer ablief. Nervöse Störungen traten im Mittel nach 23 Tagen auf und bei ununterbrochener Dosierung starben die Tiere nach 23 bzw. 32 und 56 Tagen.

Noch langsamer verlief die Vergiftung mit Dosen von 0,5 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich. Auch diese Dosis wirkte bei 3 Hunden nach 25- bzw. 39- und 73tägiger Anwendung noch tödlich. Nervöse Störungen wurden erst nach 40 Tagen beobachtet.

Dosen von 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich wurden längere Zeit ohne schwere Störungen vertragen. Jedoch war besonders bei lebhaften Tieren nach 2—3 Wochen eine Beruhigung zu erkennen. Bei 3 Tieren traten nervöse Störungen erst nach einer Behandlung von 42 bzw. 50 und 70 Tagen auf. Das Tier, das esrt am 70. Tage nervöse Störungen erlitt, war nach 3tägiger Pause wieder gebessert und ertrug weiterhin die Behandlung mit 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol ohne Schaden bis zum 180. Tage, wo die chronische Vergiftung mit einer akuten beendet wurde. Vier weitere Hunde wurden 20, 25, 30 und 40 Tage mit 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol behandelt, ohne daß die Tiere sichtbar geschädigt wurden.

Die Injektion von 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol konnte bei einem Hunde 122 Tage fortgesetzt werden, dann traten jedoch nervöse Störungen und 4 Tage später auch Krämpfe ein, und am 144. Tage starb der Hund. Ein anderer Hund wurde 8 Monate lang mit 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich behandelt ohne jemals irgendwelche Störungen zu zeigen. Sein Gewicht nahm sogar zu, während die meisten Hunde bei der langdauernden Behandlung mit 0,2 oder 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol Gewicht verloren.

Bei 3 Hunden wurden nach einer 30- bzw. 40- und 180tägigen Behandlung mit 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol je Tag Vergiftungen mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol durchgeführt. Alle 3 Tiere bekamen Krämpfe

Tabelle 1. *Änderung des Gewichtes, der Blutfarbstoffkonzentration, der* HEINZ*licher Injektion verschiedener*

Hund	Dosis	Gewicht		Blutfarbstoff in g/100 ml			Durchschnittliche HEINZ-Körper-Konzentration
		zu Beginn	am Ende	zu Beginn	niedrigste Konzentration nach der ersten Injektions-Periode	am Ende	
	mg/kg	kg	kg				%
115	6	8,3	7,5	15,5	10,5	10,5	
101	2	24	17,4	12,3	7,5	9,0	54
102	2	20	15,0	16,2	10,2	10,2	24
103	2	10,4	9,5	14,7	12,1	12,1	47
104	2	18,5	15,5	11,9	5,1		31
105	2	15,4	12,0	16,8	12,5	12,5	37
112	1,5	23	21	18,6	12,5	12,5	30
113	1,5	16,5	16,5	14,5	16,0	16,0	25
114	1,5	22	21	17,2	10,5	10,5	15
120	1,5	9,7	8,5	17,8	11,5	11,5	40
121	1,5	11	9,5	15,8	9,0	12	30
122	1,5	26,5	23	15,8	10,7	9,2	43
123	1,5	18,6	14	14,3	11,0	7,5	38
124	1,5	9,0	9,5	14,2	6,5	13,8	40
GS 2	1,5	17,6	10,3	12,7	11,2	12,2	25
GS 3	1,5	12,7	11,6	13,6	10,5	10,5	20
GS 4	1,5	9,5	8,5	10,5	7,3	8,8	37
GS 5	1,5	14,0	12,5	14,4	11,3	12,4	31
109	1,0	6,0	4,2	14,5	12,6	12,6	21
110	1,0	12,0	7,1	16,3	2,2	2,2	30
111	1,0	19,7	16,8	15,0	12,1	12,1	24
106	0,5	6,5	4,3	15,4	14,0	12,3	20
107	0,5	8,0	4,0	12,5	7,6	7,6	17
108	0,5	10,5	10,0	17,3	12,5	12,5	15
104	0,2	18,0	15,5	11,0	8,5	8,5	15
116	0,2	17,5	20,0	15,5	12,0	12,0	10
117	0,2	26,5	21,0	15,8	10,1	10,1	6
125	0,2	22,0	20,0	17,5	12,5	12,5	12
127	0,2	19,7	17,5	16,0	12,7	12,7	12
128	0,2	16,0	16,4	15,8	12,8	12,8	8

Körperzahl, ferner Zeit bis zum Eintritt nervöser Störungen und des Todes bei täg- Dosen von m-Dinitrobenzol.

Beginn nervöser Störungen nach Tagen	Beginn von Krämpfen nach Tagen	Tod nach Tagen	Bemerkungen
7	7	8	Injektion nur am 1., 2., 6., 7. und 8. Tag
15	—	24	
8	8	10	
5	6	8	Injektionen 9 Tage lang
—	—	—	
7	7	8	
12	13	(17)	getötet
17	21	27	
12	13	(17)	getötet
15	16	17	Injektion nach 16 Tagen beendet
13	14	113	Injektion vom 13.—22., 26.—34., 41.—44., 50.—52., 62.—113. Tage unterbrochen
7	8	22	Injektion vom 8.—14. Tag unterbrochen, am 20. Tag beendet
8	9	37	Injektion unterbrochen vom 9.—13., 20.—21., 24.—26., 33.—37. Tag
9	9	74	Injektion vom 9.—30., 38.—42. und 64. bis 74. Tag unterbrochen
13	13	74	Injektionen vom 13.—20., 23.—25., 32.—34., 41.—44., 50.—53., 57.—59., 61.—74. Tage unterbrochen
25	27	28	Injektionen nach 27 Tagen abgebrochen
24	30	46	Injektionen vom 24.—28., 30.—46. Tag unterbrochen
17	17	32	Injektionen am 17. Tage abgebrochen
12	12	23	
21	29	32	
37	37	56	
62	66	83	Injektion vom 62.—73. Tag unterbrochen
25	—	25	
34	36	39	
50	64	68	2 Monate vorher 9 Tage lang mit 2 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich behandelt, s. oben
180	—	—	Injektion vom 70.—73. Tage unterbrochen, danach Fortsetzung der Injektion bei gutem Zustand bis zum 180. Tage. Dann akute Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol (Krämpfe, Tod nach 4 Tagen)
42	48	48	
—	—	—	40 Tage behandelt, danach Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol, (leichte Krämpfe, überlebt)
—	—	—	20 Tage behandelt, danach Vergiftung mit 20 mg/kg m-Dinitrobenzol (Krämpfe, überlebt)
—	—	—	25 Tage behandelt, danach Vergiftung mit 20 mg/kg m-Dinitrobenzol (Krämpfe, Tod nach 7 Stunden)

Tabelle 1.

Hund	Dosis mg/kg	Gewicht zu Beginn kg	Gewicht am Ende kg	Blutfarbstoff in g/100 ml zu Beginn	Blutfarbstoff in g/100 ml niedrigste Konzentration nach der ersten Injektions-Periode	Blutfarbstoff in g/100 ml am Ende	Durchschnittliche HEINZ-Körper-Konzentration %
129	0,2	15,7	14,5	18,0	13,0	13,0	6
118	0,1	16,5	12,5	14,2	11,0	9,5	5
119	0,1	9,2	10,8	16,6	15,0	15,0	5

und 2 starben. Von 2 Hunden, die nach 20- bzw. 25tägiger Behandlung mit 0,2 mg/kg Dinitrobenzol 20 mg/kg erhielten, überlebte einer, während der andere 7 Stunden nach der Injektion starb.

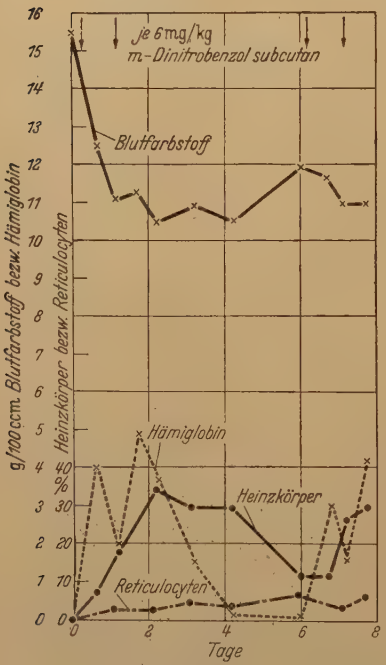


Abb. 1. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins, der HEINZ-Körper und Retikulozyten nach mehrfacher Injektion von 6 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 115. 3,8 kg. m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst subkutan injiziert.

2. *Veränderungen des Blutes.*

Bei allen angewandten Dosen und allen Tieren wurden Veränderungen des Blutes beobachtet. Zeitpunkt ihres Eintritt und ihr Ausmaß waren von der Dosierung abhängig. Die Veränderungen des Blutes waren die gleichen, die bei den Vergiftungen mit größeren Dosen eintraten: Bildung von HEINZ-Körpern, Anämie und Hämiglobinbildung. Diese trat aber immer mehr in den Hintergrund je kleiner die täglich verabreichte Dosis war. Nach täglichen Dosen unter 1 mg/kg stieg die Hämiglobinkonzentration nur ganz selten über 0,5 g/100 ml.

Nach der Injektion von 6 mg/kg m-Dinitrobenzol kam es noch zu einer Erhöhung der Hämiglobinkonzentration. Die Wiederholung der Dosis am folgenden Tage erhöhte sie noch mehr. Die Blutfarbstoffkonzentration sank schon am ersten Tage. 30% der roten Zellen hatten HEINZ-Körper. Die Retikulozyten nahmen nur wenig zu (Abb. 1).

(Fortsetzung.)

Beginn nervöser Störungen nach Tagen	Beginn von Krämpfen nach Tagen	Tod nach Tagen	Bemerkungen
—	—	—	30 Tage behandelt, danach Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol (Krämpfe, Tod nach 7 Tagen)
122	126	144	Injektionen am 142. Tage abgebrochen
—	—	—	Injektionen nach 8 Monaten abgebrochen.

Die Blutveränderungen nach täglicher Injektion von 2,0, 1,5 und 1,0 mg/kg waren sehr ähnlich. Die Veränderungen der einzelnen Größen waren sehr unregelmäßig und streuten stark, so daß Unterschiede in der Wirkung der 3 Dosen bei den uns zur Auswertung verfügbaren Versuchszahlen nicht mit ganz befriedigender Genauigkeit erfaßt wurden. Es ist auch äußerst schwierig, zum Teil sogar ganz unmöglich, die Versuche durch einige Zahlenwerte zu charakterisieren, um dann aus der Mehrzahl der Versuche mit einer bestimmten Dosis einen „durchschnittlichen Verlauf" der chronischen Wirkung der betreffenden Dosis darzustellen.

Wir haben aber versucht, 2 wesentliche Wirkungen der verschiedenen Dosen durch einfache Zahlen zu erfassen, und zwar die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration im Zeitraum bis zur ersten Unterbrechung der Dosierung und eine „durchschnittliche HEINZ-Körper-Konzentration", die das Mittel aus den Messungen vom sechsten Tage nach Beginn der Vergiftung bis zur ersten Unterbrechung der Dosierung darstellt. Die Mittel dieser beiden Werte für die verschiedenen Dosengrößen sind in Tabelle 2 (S. 523) zusammengestellt. Sind diese Werte auch ein gewisses Maß für die Stärke der Wirkung einer bestimmten Dosis, soweit sie sich in den Blutveränderungen manifestiert, so müssen die Wirkungen dennoch an mehreren Beispielen, deren Ablauf in Kurven dargestellt ist, beschrieben werden. Dabei sollen die Versuche mit täglichen Dosen von 2,0, 1,5 und 1,0 gemeinsam beschrieben werden.

Bei 19 von 20 Tieren dieser Gruppe nahm unter der chronischen Wirkung des m-Dinitrobenzols die Blutfarbstoffkonzentration ab. In einzelnen Fällen setzte die Abnahme sogar ziemlich schnell ein. Immer war sie nach 5—6 Tagen erkennbar. Ihr Verlauf war verschieden. Während bei wenig mehr als der Hälfte der Tiere die Blutfarbstoffkonzentration mit nur geringeren Schwankungen auf ihren tiefsten Wert sank wie in den Versuchen der Abb. 2 und 3, traten bei anderen Tieren stärkere Schwankungen auf oder gar, wie im Versuch der Abb. 4,

nach einer beträchtlichen Abnahme der Konzentration eine Rückkehr auf den Ausgangswert unter der Wirkung des m-Dinitrobenzols. Mußten wegen nervöser Störungen längere Unterbrechungen in der Verabreichung von m-Dinitrobenzol eintreten, so wurde der weitere Verlauf der Blutfarbstoffkonzentration natürlich aus diesem Grunde unregelmäßig. Die Geschwindigkeit der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration hing von der Größe der täglichen Dosis ab. Bei täglicher

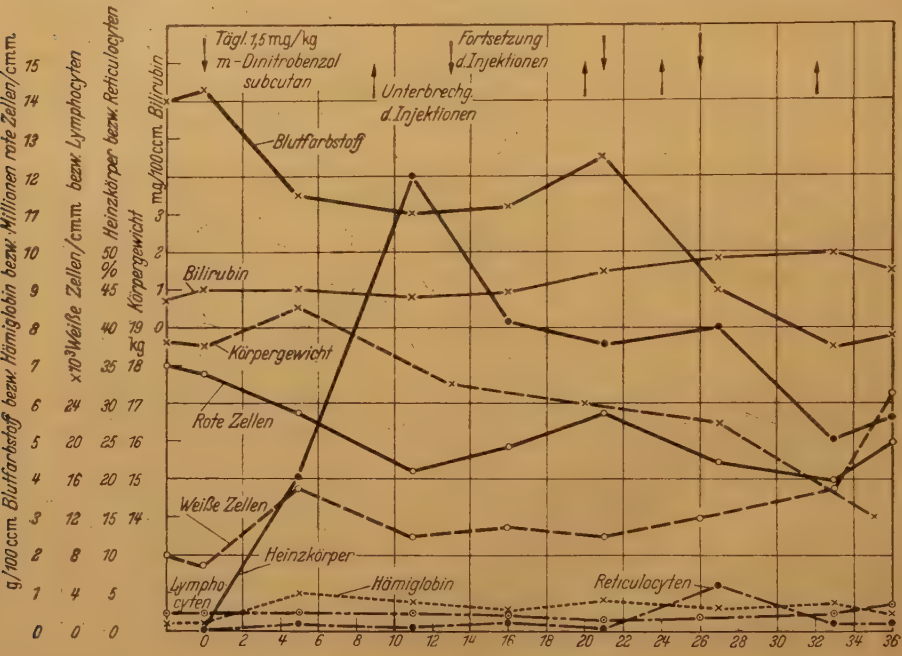


Abb. 2. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins, der roten Zellen, weißen Zellen, HEINZ-Körper, Retikulozyten und des Körpergewichts bei täglicher Injektion von 1,5 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 123. m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst subkutan injiziert.

Dosis von 2,0 mg/kg m-Dinitrobenzol betrug sie beim Eintritt nervöser Störungen im Mittel 5,0 g/100 ml oder 35% ± 4,6, bei 1,0 mg/kg wurde das Mittel aus nur 3 Versuchen durch einen ungewöhnlichen Versuchsverlauf (Abb. 3) beeinträchtigt. Die beiden anderen Werte waren kleiner als 10 der 12 Werte der Versuchsreihe mit 1,5 mg/kg. In dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch fiel die Blutfarbstoffkonzentration in 33 Tagen gradlinig von 16,3 auf 2,2 g/100 ml. Eine ähnliche unaufhaltbare Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration wurde in keinem weiteren Versuch beobachtet.

Die Konzentration der roten Zellen änderte sich bis auf kleine Abweichungen gleichsinnig mit der Blutfarbstoffkonzentration. Aniso-

zytose und Poikilozytose geringen Grades wurde nur in 3 Versuchen beobachtet, Polychromasie häufiger. Kernhaltige rote Zellen in einer Konzentration von etwa 1% der roten Zellen traten bei 7 Tieren auf.

In allen Versuchen wurden an den roten Zellen HEINZ-Körper beobachtet. Ihre Zahl nahm im allgemeinen 6—10 Tage lang zu und bewegte sich dann unter Schwankungen im Bereich zwischen 20 und

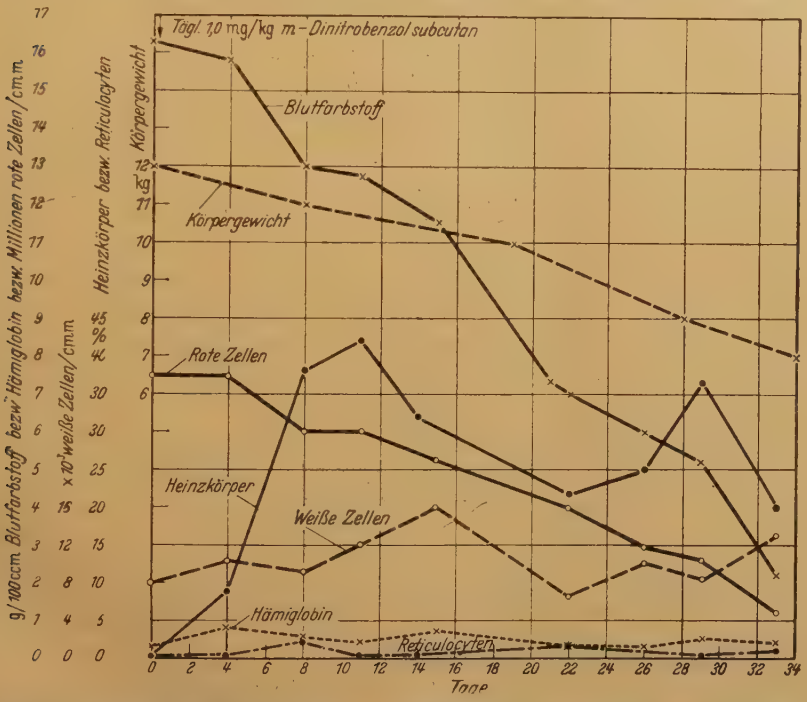


Abb. 3. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins, der roten Zellen, weißen Zellen, HEINZ-Körper, Retikulozyten und des Körpergewichts bei täglicher Injektion von 1,0 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 110. m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst subkutan injiziert.

50% der roten Zellen. Die durchschnittliche HEINZ-Körper-Konzentration betrug bei der Dosis von 2 mg/kg 38%, bei 1,5 mg/kg 31% und bei 1,0 mg/kg 25% der roten Zellen (Tabelle 2). In Größe und Form ähnelten die HEINZ-Körper denen, die unter der Einwirkung größerer Dosen von m-Dinitrobenzol gebildet wurden.

Die größten Unregelmäßigkeiten zeigten die Retikulozyten in ihrer Zahl wie im Zeitpunkt ihrer stärksten Vermehrung. Während in den meisten Versuchen eine allmähliche Zunahme erfolgte, trat in wenigen Versuchen nach einem schnellen Abfall der Blutfarbstoffkonzentration ein Anstieg der Retikulozyten bis zu 10% der roten Zellen oder gar noch höher ein. Diesem folgte dann ein Anstieg der Konzentration der

roten Zellen und des Blutfarbstoffs (Abb. 4). Retikulozytenkonzentrationen von 10% und darüber wurden aber nur in 2 Versuchen beobachtet. In den anderen Versuchen bewegten sich die Retikulozytenkonzentrationen zwischen 1 und 3% der roten Zellen und erhoben sich nur vorübergehend auf 5% oder wenig darüber. Solche vorübergehenden Zunahmen folgten in mehreren Versuchen auf ein schnelleres Absinken der Blutfarbstoffkonzentration, in anderen waren solche

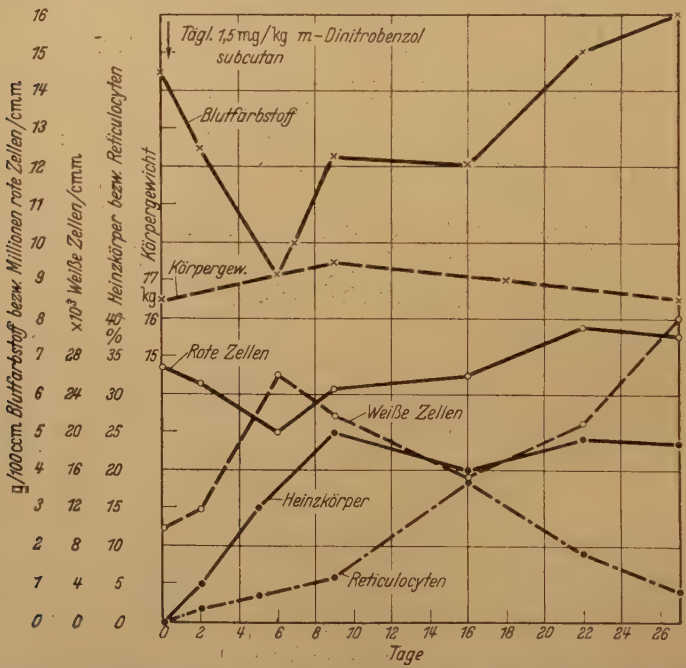


Abb. 4. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, der roten Zellen, weißen Zellen, HEINZ-Körper, Retikulozyten und des Körpergewichts bei täglicher Injektion von 1,5 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 113. m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl gelöst subkutan injiziert.

Beziehungen nicht zu erkennen. In dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch erfolgte trotz der überaus starken Verminderung der Blutfarbstoffkonzentration kein stärkerer Anstieg der Retikulozyten. Zu Beginn des Versuches wurde einmal eine Konzentration von 2% der roten Zellen erreicht. Im weiteren Verlauf blieben sie aber darunter.

Bei 10 Versuchen wurden wiederholt Bestimmungen der osmotischen Resistenz der roten Zellen durchgeführt. Vor der Behandlung mit m-Dinitrobenzol hämolysierten 50% der roten Zellen in Kochsalzlösung von 3,8—3,9 g/100 ml. In 5 Versuchen trat im Laufe der chronischen m-Dinitrobenzolvergiftung eine Verschiebung dieses Wertes in den Bereich höherer Kochsalzkonzentrationen ein, d. h. eine Abnahme

der osmotischen Resistenz. Besonders stark war diese in dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch, wo sich der 50%-Hämolysewert von 3,9 auf 5,6 g/100 ml Kochsalz verschob. In den anderen Versuchen war die Abnahme der Resistenz geringer, nämlich von 3,8—3,9 auf 4,4 bis 4,7 g/100 ml als 50%-Hämolysekonzentration.

Die Hämiglobinkonzentration wurde durch Dosen von 1—2 mg/kg m-Dinitrobenzol nur sehr wenig erhöht. Nur ausnahmsweise wurden Konzentrationen zwischen 1 und 1,5 g/100 ml gemessen. Meist bewegte sich die Konzentration zwischen 0,5 und 1,0 g/100 ml und war oft auch unter 0,5 g/100 ml. Erhöhungen der Verdoglobinkonzentration über die Norm wurden nicht beobachtet.

Die Zahl der weißen Zellen nahm immer zu. In einigen Versuchen war die Zunahme sogar beträchtlich, von etwa 10000 Zellen je Kubikmillimeter auf 30—40000. In anderen Versuchen war sie geringer und vorübergehend. Die Verteilung der weißen Zellen wies gegenüber dem Ausgangszustand keine auffälligen Veränderungen auf. Die Zunahme der weißen Zellen und ihre Schwankungen betraf vornehmlich die segmentkernigen Zellen, während sich die Konzentration der Lymphozyten nur wenig änderte, z. B. Abb. 2. Stabkernige Zellen wurden nur einmal zu 10% der weißen Zellen gefunden, sonst immer unter 7%. Die Monozyten schwankten zwischen 1 und 3%. Bei 4 Hunden nahmen die eosinophilen Zellen um 2 bzw. 3 und 4% zu.

Bei der Hälfte der Tiere waren regelmäßige Bestimmungen des Bilirubingehalts des Serums durchgeführt worden. Drei von den 10 Tieren wiesen im Laufe der Vergiftung eine Zunahme der Bilirubinkonzentration über 1,5 mg/100 ml auf, die über die normalen Schwankungen hinausging.

Wurden die täglich injizierten Dosen vermindert auf 0,5, 0,2 und 0,1 mg/kg, so trat die Hämiglobinbildung ganz in den Hintergrund, die anderen Veränderungen des Blutes blieben grundsätzlich erhalten, jedoch bestanden quantitative Unterschiede. Bereits in den Versuchen mit täglicher Injektion von 0,5 mg/kg m-Dinitrobenzol war eine Beruhigung im Ablauf der Veränderungen wahrzunehmen und noch mehr in den Versuchen mit täglicher Injektion von 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol (Abb. 5). Doch war der Verlauf durchaus nicht immer gleichförmig. Wenn auch die Blutfarbstoffkonzentration im allgemeinen abnahm, so trat die Verminderung doch mehrfach in Form von Krisen ein. So etwa in dem sehr langsam ablaufenden Versuch mit 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich (Abb. 6). In den ersten 40 Tagen nahm die Blutfarbstoffkonzentration im Mittel nicht ab und sank dann im Laufe von 12 Tagen um 2 g/100 ml ab unter gleichzeitiger Gewichtsabnahme des Hundes. In der Mehrzahl der Versuche trat gegen Ende der Vergiftungen, also mit dem Beginn nervöser Störungen ein stärkerer Abfall

der Blutfarbstoffkonzentration ein. Länger anhaltende Besserungen der Anämie während der Verabreichung von m-Dinitrobenzol wurden bei diesen Versuchen nicht beobachtet wie in den Versuchen mit

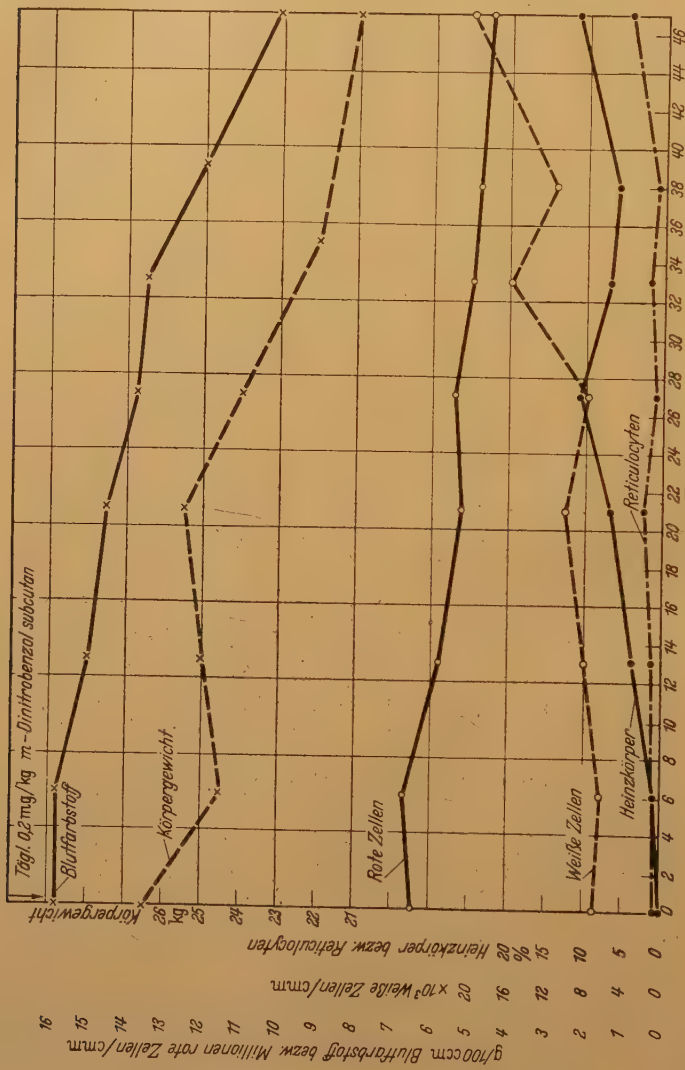


Abb. 5. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, der roten Zellen, weißen Zellen, HEINZ-Körper, Retikulozyten und des Körpergewichts bei täglicher Injektion von 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 117. m-Dinitrobenzol zu 1% in Mohnöl gelöst subkutan injiziert.

größeren Dosen (Abb. 4). Keins der Tiere hatte zur Zeit des Auftretens nervöser Störungen oder gar beim Tode noch die gleiche Blutfarbstoffkonzentration wie zu Beginn des Versuches. Meist waren die Abnahmen der Blutfarbstoffkonzentration von Vermehrungen der Retikulozyten begleitet oder gefolgt, deren Konzentration sich meist unter

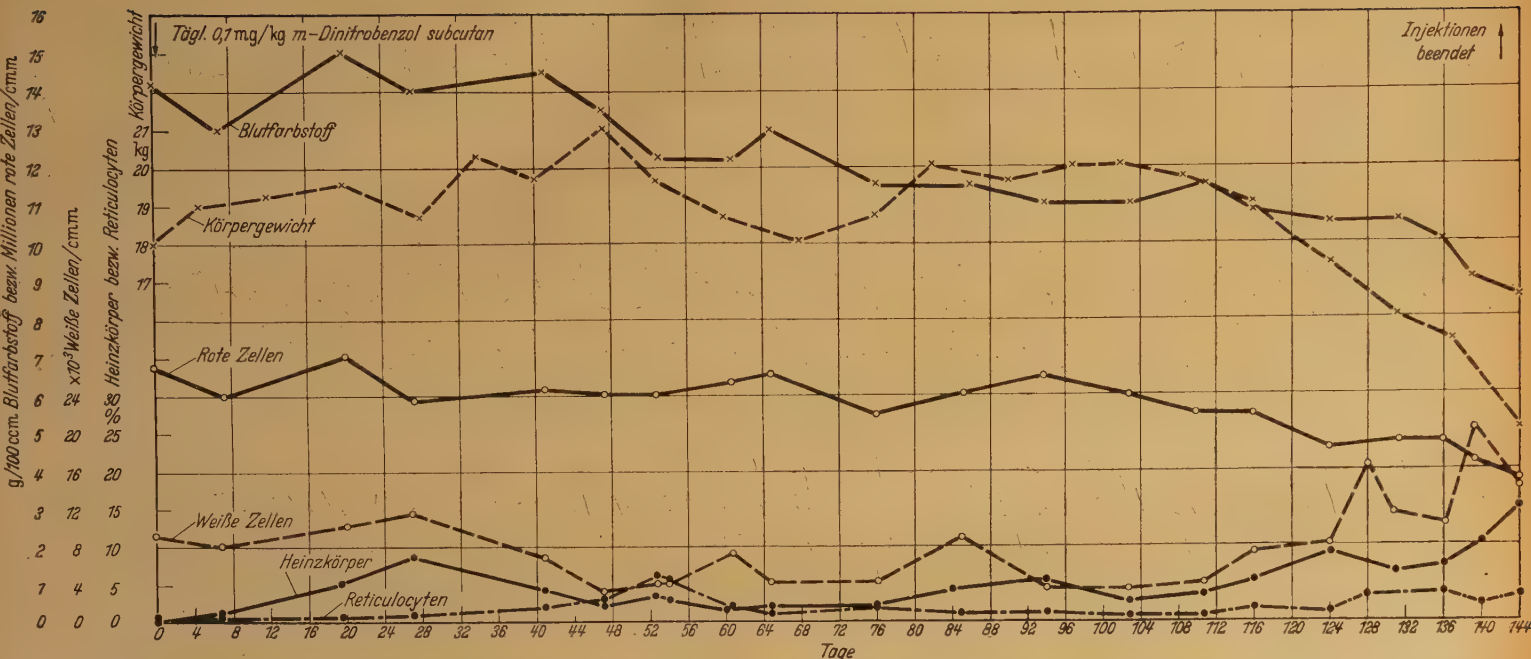


Abb. 6. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, der roten Zellen, weißen Zellen, HEINZ-Körper, Retikulozyten und des Körpergewichts bei täglicher Injektion von 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol. Hund 118. m-Dinitrobenzol zu 1% in Mohnöl gelöst subkutan injiziert.

3% der roten Zellen bewegte und nur selten und vorübergehend auf 5% oder gar höher anstieg. Der Grad der Verminderung der Blutfarbstoffkonzentration war nur wenig geringer als in den Versuchen mit höheren Dosen. So wurde in den Versuchen mit 0,5 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich die Blutfarbstoffkonzentration im Mittel um $3{,}7 \pm 1{,}0$ g je g/100 ml oder $26 \pm 7{,}6$% der ursprünglichen Konzentration vermindert, in den Versuchen mit 0,2 mg/kg um $4{,}0 \pm 0{,}4$ g/100 ml bzw. $25 \pm 2{,}7$% und in den Versuchen mit 0,1 mg/kg um $2{,}4 \pm 0{,}5$ bzw. $16 \pm 4{,}6$%. Die Zusammenstellung der Werte in Tabelle 2 zeigt, daß die bei verschiedener Dosierung erreichte Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration nur sehr wenig von der Größe der täglichen Dosis abhängig war. So betrug die Abnahme bei täglicher Dosis von 0,2 mg/kg $4{,}0 \pm 0{,}4$ g/100 ml oder $25 \pm 2{,}7$% der Konzentration am Anfang des Versuches und bei täglicher Dosis von 1,5 mg/kg, also der $7^1/_2$fachen Dosis, $4{,}4 \pm 0{,}8$ bzw. $29 \pm 4{,}6$%. Jedoch stand die mittlere Geschwindigkeit der Abnahme in engerer Beziehung zur Dosis.

Während die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration in den Versuchen mit 0,5 und 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol sowie einem der Versuche mit 0,1 mg/kg fortschritt bis der Versuch durch Unterbrechung der Injektion oder den Tod des Tieres beendet wurde, stellte sich die Zahl der HEINZ-Körper nach dem Anstieg, der 5—10 Tage dauerte, offenbar auf einen bestimmten gleichbleibenden Bereich ein. Die mittlere HEINZ-Körperzahl betrug bei täglichen Dosen von 0,5 mg/kg 17% der roten Zellen, bei 0,2 mg/kg 10% und bei 0,1 mg/kg 5%. Die HEINZ-Körperzahl war von der Größe der täglichen Dosis abhängig, ihr jedoch nicht proportional. Während die HEINZ-Körperzahl mit der Größe der täglichen Dosis zunächst zunahm, wurde im Bereich höherer Dosen der Anstieg der HEINZ-Körperzahl mit der Dosis wesentlich geringer.

Die Zahl der weißen Zellen bewegte sich in den meisten Versuchen für längere Zeit kaum aus den normalen Schwankungen heraus, nahm aber regelmäßig zum Schlusse des Versuches zu (Abb. 5 und 6). Bei dem in Abb. 6 wiedergegebenen Versuch, traten wiederholt Abnahmen der weißen Zellen auf 3000 und 4000 Zellen/μl. In anderen chronischen Versuchen wurde eine ähnliche Verminderung nicht beobachtet. Aber auch in dem Versuch der Abb. 6 stieg zum Schluß die Zahl der weißen Zellen an. Die Zusammensetzung der weißen Zellen war in den Versuchen mit kleineren Tagesdosen ähnlich wie bei größeren. Die Zunahmen betrafen ebenfalls vornehmlich die segmentkernigen Zellen.

In mehreren Versuchen wurden regelmäßig Bestimmungen der osmotischen Resistenz der roten Zellen durchgeführt. Nur in einem Versuch mit einer täglichen Dosis von 0,5 mg/kg wurde eine länger anhaltende Verminderung der osmotischen Resistenz beobachtet, 50% Hämolysewert 4,2 g/100 ml Kochsalz gegenüber 3,8 zu Beginn des Versuches.

Im Serum eines Hundes, der die tägliche Dosis von 0,2 mg/kg m-Dinitrobenzol erhielt, wurde Hämatin gefunden. Bei den anderen Tieren gelang der Nachweis nicht.

3. Harn.

Eiweiß, Zucker und Bilirubin wurden im Harn der Hunde nie vermehrt gefunden, ebenso keine pathologischen Zellen. Dagegen war bei der Hälfte der Tiere im Verlaufe der m-Dinitrobenzolvergiftung eine Zunahme der Ausscheidung von Urobilinogen zu beobachten.

4. Veränderungen anderer Organe.

Die Untersuchung der Organe ergab bei allen Tieren gewisse pathologische Veränderungen, die in ihrem Ausmaß wechselten. Ein sicherer Unterschied zwischen den kürzere Zeit mit größeren Dosen und längere Zeit mit kleineren Dosen behandelten Tieren war nicht nachzuweisen. Bei der Sektion waren bereits einige gröbere Veränderungen festzustellen: die starke Hämosiderose von Leber und Milz sowie in einigen Fällen auch der Niere und das Vorhandensein von rotem Mark in der ganzen Länge der Röhrenknochen. Die Lebern von 2 Tieren, die täglich 2 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten, ließen auf dem Schnitt Trübung des Parenchyms erkennen, die zweier anderer Tiere Muskatnuszeichnung. Bei den meisten Tieren wurde die Gallenblase prall gefüllt mit dunkler Galle gefunden. Die Milzen aller Tiere waren groß und derb. Die histologische Untersuchung ergab bei allen Lebern morphologische Veränderungen. Die Struktur war umgebaut in einzelnen Fällen bis zur völligen Verschiebung der normalen Struktur, daneben bestanden atrophische Bezirke. In der Leber einiger Hunde waren vereinzelt Nekrosen von Läppchengröße vorhanden. Die Leberzellen waren getrübt und häufig dissoziiert. Leberzellen und Sternzellen enthielten dunkles Pigment. Die Zentren der Läppchen wiesen feintropfige Verfettung auf. Außer den Leberzellen enthielten auch Endothelzellen feintropfiges Fett. Diese waren vielfach abgeschilfert. Die Sternzellen enthielten Stromareste der roten Zellen und waren übervoll von Eisen. Vermehrung des Bindegewebes war nicht zu beobachten. Die Endothelzellen der Milz enthielten Stromareste, Pigment und große Mengen Eisen. In den Nieren waren die Veränderungen gering. Die Epithelien der gewundenen und geraden Harnkanälchen enthielten geringe Mengen Fett, das in Form und Menge von normalen Nieren nicht abwich. Daneben war sowohl in Epithelzellen wie im Zwischengewebe Eisen abgelagert.

5. Die Wirksamkeit des m-Dinitrobenzols nach Gabe in den Magen.

Zur Prüfung der Wirksamkeit des m-Dinitrobenzols nach Verabreichung in den Magen wurden 2 Hunden Dosen von 1,0 mg/kg — und

für einige Tage von 2,0 mg/kg — in einer Mehlabkochung täglich durch die Schlundsonde gegeben. Der Allgemeinzustand der Tiere blieb über 4 Monate gut, beide nahmen ein wenig an Gewicht zu. Die Blutfarbstoffkonzentration sank von 14 auf 12 bzw. von 17 auf 15 g/100 ml Blut ab. HEINZ-Körper waren an 0,1—1% der roten Zellen vorhanden, die Hämiglobinkonzentration war unter 0,5 g/100 ml. Nach 4 Monaten wurde die Dosis auf 2 mg/kg täglich erhöht. Ein Hund begann 5 Tage danach mit steifen Beinen zu laufen und bekam am folgenden Tage Krämpfe. Bei beiden Tieren wurde nach 7 Dosen von 2 mg/kg je Tag die Dosis wieder auf 1 mg/kg je Tag erniedrigt. Nach den Dosen von 2 mg/kg je Tag nahmen die HEINZ-Körper auf 10—20% der roten Zellen zu, die Blutfarbstoffkonzentration sank in 10—20 Tagen um weitere 3,5 bzw. 4,0 g/100 ml ab. Während der folgenden Gabe von 1 mg/kg je Tag stieg sie im Laufe von 4 Wochen wieder auf den vorigen Wert an; die HEINZ-Körper wurden wieder auf Werte unter 1% der roten Zellen vermindert. In der Folgezeit blieb der Zustand bis zum Abbruch des Versuchs (9 Monate nach Beginn) unverändert.

Besprechung.

Unter der langdauernden Einwirkung kleiner Dosen von m-Dinitrobenzol traten beim Hunde keine grundsätzlich anderen Wirkungen auf als bei der akuten Vergiftung. Diese betrafen in beiden Fällen vornehmlich das Blut (Knochenmark), das Zentralnervensystem und die Leber. Allerdings waren die Wirkungen an den Organen ein wenig verschieden infolge der kleinen Dosis und der langen Dauer. So trat im Blut die Hämiglobinbildung nicht mehr in den Vordergrund, weil ihre Geschwindigkeit bei den kleinen m-Dinitrobenzolkonzentrationen so gering war, daß die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration nur eben noch feststellbar war In der Leber liefen Prozesse ab wie Atrophie und Umbau der Struktur, die in den kurzen Zeiträumen einer akuten Vergiftung nicht möglich sind.

Die Gleichartigkeit der Wirkung großer und wiederholter kleiner Dosen läßt vermuten, daß es sich in diesem Falle um Addition von Wirkung handelt wie wir sie bei verschiedenen Stoffen kennen und als Kumulation bezeichnen. Die Kurven des Versuchsverlaufs, die einen ständigen Fortschritt einiger Wirkungen zeigen, weisen in die gleiche Richtung. Die Untersuchung der quantitativen Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung bringt schließlich eine Bestätigung dieser Annahme.

Aber nicht alle Veränderungen wachsen fortlaufend mit der Dauer der Einwirkung einer kleinen Dosis m-Dinitrobenzol. So nimmt die Hämiglobin*konzentration* im Blute nicht fortschreitend zu, sondern stellt sich auf ein Gleichgewicht ein, obwohl die Hämiglobin*bildung* ständig fortschreitet. Die Wirkung wird hier schnell durch die Reduk-

tion des Hämiglobins repariert. Bei der Erörterung von Untersuchungen über die Wirkung großer Dosen m-Dinitrobenzol wurden diese Beziehungen bereits ausführlich dargestellt (KIESE[1]). Es sei aber angedeutet, wie große Mengen Hämiglobin im Laufe von 20 Tagen unter der Wirkung von 1 mg/kg m-Dinitrobenzol gebildet werden. Die Hämiglobinkonzentration bewegte sich in diesen Versuchen zwischen 0,5 und 1,0 g/100 ml Blut. Bei diesen Konzentrationen beträgt die Reduktionsgeschwindigkeit des Hämiglobins etwa ein Drittel bis die Hälfte der Geschwindigkeit bei Konzentrationen über 2 g/100 ml (KIESE[3]). Demnach wäre beim Hunde eine Reduktionsgeschwindigkeit von etwa 1,0 g/100 ml/Stunde anzunehmen (KIESE[3]). Im Laufe von 20 Tagen würden dann etwa 480 g Hämiglobin je 100 ml Blut gebildet werden. Im Mittel wurde jede Hämoglobinmolekel 50mal zu Hämiglobin oxydiert und wieder reduziert. Die Hämiglobinbildung war also erheblich größer, wenn 20 Tage lang je 1 mg m-Dinitrobenzol injiziert wurde, als wenn 20 mg in einer Dosis angewandt wurden (480 g gegenüber 190 g). Ein Grund für diese größere Ausbeute an Hämiglobin ist sicher der Ablauf der Hämiglobinbildung bei einer höheren Hämoglobinkonzentration. Bei der Wirkung des m-Dinitrobenzols in höherer Konzentration geht die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung infolge Verminderung der Hämoglobinkonzentration nur wenig über die maximale Reduktionsgeschwindigkeit hinaus, während konzentrationsabhängige Abbau- und Ausscheidungsreaktionen bei der höheren Konzentration entsprechend schneller ablaufen und das m-Dinitrobenzol schneller seiner Wirkung am Blutfarbstoff entziehen. Man kann hier an der Hämiglobinbildung einen Zusammenhang klarer übersehen, der auch für andere Wirkungen und Gifte gilt, nämlich daß mit einer bestimmten Menge des Giftes mehr Wirkung — wenn auch vielleicht keine stärkere Wirkung — erzielt wird, wenn sie in mehreren kleinen Dosen verabreicht wird als wenn sie in einmaliger Dosis zur Wirkung kommt.

Das kann übrigens in anderen Fällen noch andere Ursachen haben, deren Erörterung hier zu weit führen würde, aber sie sind nicht immer so klar zu übersehen.

Eine andere Veränderung schritt ebenfalls nicht ständig fort, sondern stellte sich, freilich unter Schwankungen, auf einen gleichbleibenden Wert ein: Die Zahl der HEINZ-Körper, genauer der Anteil der roten Zellen mit HEINZ-Körpern an der Gesamtzahl der roten Zellen. Dieser Anteil wuchs mit der Größe der täglichen m-Dinitrobenzoldosis, jedoch nicht ihr proportional, sondern in der in Abb. 7 dargestellten Abhängigkeit. Mit steigender m-Dinitrobenzoldosis wurde die Zunahme der

[1] KIESE, M.: Biochem. Z. 316, 264 (1944).

HEINZ-Körper geringer. Die Entstehung einer mehr oder minder gleichbleibenden Zahl von HEINZ-Körpern ist aus dem Zusammenwirken der Bildungsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit der Elimination der roten Zellen mit HEINZ-Körpern anzunehmen. Daraus wird auch die Abhängigkeit der HEINZ-Körperzahl von der Größe der täglichen m-Dinitrobenzoldosis in ähnlicher Weise verständlich wie die der Hämiglobinkonzentration von der m-Dinitrobenzoldosis. Die Bildung der HEINZ-Körper verläuft zwar nicht ganz so schnell wie die Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin aber in Anbetracht der Dauer unserer chronischen Vergiftungen recht schnell. Nach einer einmaligen Dosis von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol wurde die maximale HEINZ-Körperzahl in 36 Stunden erreicht. Die Dauer des Anstiegs der HEINZ-Körper bis zu dem für die betreffende m-Dinitrobenzoldosis charakteristischen Wert gibt dann ein ungefähres Maß für die Zeit, die erforderlich ist, um durch tägliche Injektion von m-Dinitrobenzol eine im Mittel gleichbleibende Konzentration von m-Dinitrobenzol im Hunde zu erreichen. Da die HEINZ-Körpermenge nach 6—8 Tagen ihren charakteristischen Wert erreichte, dürfte es 4 bis 7 Tage gedauert haben, bis die m-Dinitrobenzolkonzentration im Hunde so hoch war, daß die tägliche Ausscheidung und der Abbau der täglichen Zufuhr gleich groß wurde. Das steht im Einklang mit der Beobachtung, daß eine einmalige Dosis von m-Dinitrobenzol wesentlich länger als 24 Stunden wirkt.

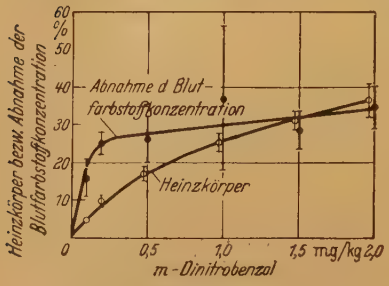


Abb. 7. Abhängigkeit der HEINZ-Körperzahl und der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration (bis zum Auftreten nervöser Störungen) von der Größe der täglichen Dosis m-Dinitrobenzol. Die HEINZ-Körperzahl ist in Prozent der roten Zellen, die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration in Prozent der ursprünglichen Konzentration angegeben. Die Marken geben die Mittelwerte und die Länge der senkrechten Striche ihre Streuung an.
ooo HEINZ-Körper, ●●● Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration.

Im Gegensatz zur Zunahme der Konzentration des Hämiglobins und der HEINZ-Körper waren andere Veränderungen fortschreitend solange m-Dinitrobenzol im Organismus vorhanden war: Die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration und jene unbekannten Veränderungen im Zentralnervensystem, die sich in Lähmungen und Krämpfen manifestierten, wenn sie einen bestimmten Umfang erreicht hatten. Es mußte sich hier also um Veränderungen handeln, die nur sehr langsam repariert werden konnten, jedenfalls langsamer als sie vom m-Dinitrobenzol erwirkt wurden.

Die Dauer der m-Dinitrobenzoleinwirkung bis zum Auftreten nervöser Störungen stand in einer sehr einfachen Beziehung zur Größe

Tabelle 2. *Mittelwerte der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration und der durchschnittlichen* Heinz-*Körperzahl bei chronischer Vergiftung mit verschiedenen Dosen m-Dinitrobenzol.*

Tägliche Dosis mg/kg	Zahl der Tiere	Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration		Heinz-Körper Prozent der roten Zellen	Beginn nervöser Störungen nach Tagen	Bis zum Beginn nervöser Störungen injizierte Menge m-Dinitrobenzol mg/kg
		g/100 ml	Prozent des Ausgangswertes			
2	5	5,0±0,6	35±6	38±5	9	18
1,5	12	4,4±0,8	29±4,6	31±2,4	14	21
1,0	3	6,3±3,2	37±19	25±2,2	23	23
0,5	3	3,7±1,0	26±7,6	17±1,2	40	20
0,2	7	4,0±0,4	25±2,7	10±1,2	90	18
0,1	2	2,4±0,5	16±4,6	5	(122)	(12)

der täglichen m-Dinitrobenzoldosis, sie war ihr umgekehrt proportional. Die nervösen Störungen traten auf, wenn eine Menge von 10—20 mg/kg m-Dinitrobenzol einverleibt war (Tabelle 2). Es wurde also auch bei Verteilung der Dosis über 10—50 Tage keine größere Menge benötigt, als wenn eine einmalige Dosis verabreicht wurde. Eine Anhäufung von m-Dinitrobenzol und Speicherung über so lange Zeit kann als Ursache der weitgehenden Unabhängigkeit der Wirkung von dem Zeitraum, über den sie verteilt wird, nicht angenommen werden, da selbst eine große Dosis m-Dinitrobenzol in wenigen Tagen bis auf unwirksame Reste ausgeschieden oder abgebaut wird. Dagegen erfordert die Reparation der Schäden im Zentralnervensystem längere Zeit. Wurde die Injektion von m-Dinitrobenzol beim Auftreten nervöser Störungen unterbrochen und nach Besserung sogleich wieder fortgesetzt, so traten meist schon nach wenigen Tagen erneut wieder Störungen auf. Wir haben diese gesteigerte Empfindlichkeit für m-Dinitrobenzol auch dadurch zu messen versucht, daß wir an eine Vorbehandlung mit kleinen Dosen m-Dinitrobenzol eine Vergiftung mit großer Dosis ausschlossen. Die Zahl der Versuche ist aber für quantitative Aussagen zu klein.

Die Anhäufung von Wirkung kann über lange Zeiträume erfolgen. So traten bei täglicher Injektion von 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol noch nach 126 Tagen Krämpfe ein. Erst bei einer täglichen Dosis unter 0,1 mg/kg m-Dinitrobenzol könnte die Wirkungsgeschwindigkeit so gering werden, daß die Anhäufung der Wirkung nicht mehr die kritische Größe erreicht.

Eine Deutung der beobachteten Beziehungen zwischen Größe der täglichen Dosen und der Dauer bis zum Auftreten von Störungen im Zentralnervensystem muß zunächst annehmen, daß sich eine Wirkung

summiert, weil sie langsamer repariert als gebildet wird. Diese Wirkung muß entweder bei den niedrigen Konzentrationen des Pharmakons eine günstigere Ausbeute haben als bei hohen Konzentrationen, so daß durch diesen Überschuß an Wirkung die in der langen Wirkungsdauer niedriger Konzentrationen auftretenden Reparationen an Wirkung ausgeglichen werden, oder sie muß die Empfindlichkeit der Zellen für die m-Dinitrobenzolwirkung erhöhen, also ihre Reaktionsfähigkeit über die Dauer der Anwesenheit des m-Dinitrobenzol hinaus verändern. Eine günstigere Ausbeute an Wirkung mit kleinen Dosen und größerer Wirkungsdauer wurde auch bei der Hämiglobinbildung beobachtet. Sie ist außer unter Bedingungen, die bei der Hämiglobinbildung erörtert wurden, auch dann zu erwarten, wenn das Gift zur Wirkung mit irgendeiner reaktionsfähigen Gruppe der Zelle eine reversible Verbindung eingeht, die also dem Massenwirkungsgesetz folgt und die für die Wirkung geschwindigkeitsbestimmend ist. Das ist die einfachere Annahme gegenüber der einer Sensibilisierung durch die eigene Wirkung, die eine Kette von Reaktionen erfordert.

Die nervösen Störungen wurden als ein Ereignis betrachtet, das eintritt, sobald eine bestimmte Menge Wirkung im Zentralnervensystem angesammelt war. Das Anwachsen dieser Wirkung selbst konnte freilich nicht beobachtet werden. Das war jedoch bei der anderen fortschreitenden Veränderung möglich, der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration. In der Abb. 7 ist die mittlere Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration bis zum Zeitpunkt des Eintritts nervöser Störungen in Abhängigkeit von der Größe der täglichen m-Dinitrobenzoldosis dargestellt. Mit steigender täglicher Dosis erreichte die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration bei 0,2 mg/kg täglich einen Wert, der im Bereich von 0,2—2,0 mg/kg nur sehr wenig zunahm. Das bedeutet, daß ähnlich der Wirkung im Zentralnervensystem eine Änderung der Blutfarbstoffkonzentration von bestimmtem Ausmaße von einer bestimmten Menge m-Dinitrobenzol erzielt wurde, weitgehend unabhängig davon ob diese Menge in täglichen Dosen von 0,2 oder 2,0 mg/kg injiziert wurde. Die Geschwindigkeit der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration war dann im Mittel der Größe der täglichen Dosis m-Dinitrobenzol umgekehrt proportional. Der geringe Anstieg der Kurve im Bereich von 0,2—2,0 mg/kg ist wohl ein Maß dafür, um wieviel die Reparationsgeschwindigkeit die relative Zunahme der Wirkungsausbeute mit abnehmender täglicher Dosis übertrifft.

In der Abb. 7 ist sowohl die Abhängigkeit der HEINZ-Körperzahl wie die der Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration von der täglichen m-Dinitrobenzoldosis dargestellt. Der Unterschied im Ablauf der beiden Veränderungen drückt sich auch hier aus. Es darf wohl als sicher angenommen werden, daß die Schädigungen der roten Zellen,

die sich in der Bildung der HEINZ-Körper manifestiert, zu einer schnelleren Elimination dieser Zellen aus dem Blute führt. Die Überladung der Retikuloendothelien mit Eisen deutet auf diesen vermehrten Blutzerfall. Die Bildung der HEINZ-Körper und die Elimination ihrer roten Zellen kommen im Laufe der chronischen m-Dinitrobenzolwirkung zu einem Gleichgewicht, wodurch die Geschwindigkeit des Abbaus roter Zellen wahrscheinlich ebenfalls auf eine im Mittel gleichbleibende Größe eingestellt wird. Bei intaktem Knochenmark ist die Geschwindigkeit der Regeneration roter Zellen von der Stärke der Anämie abhängig. Man sollte somit erwarten, daß bei der chronischen m-Dinitrobenzolwirkung sich die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration auf eine bestimmte Größe einstellt, die aus den Geschwindigkeiten des Abbaus und der Regeneration der roten Zellen resultiert, wenn durch das m-Dinitrobenzol lediglich ein vermehrter Abbau roter Zellen bewirkt wird und das Knochenmark unvermindert leistungsfähig bleibt. Die Blutfarbstoffkonzentration nimmt jedoch fortschreitend ab. Es muß demnach noch eine Beeinflussung der Regeneration der roten Zellen durch das m-Dinitrobenzol eintreten. In ganz ungewöhnlichem Maße dürfte diese Wirkung in dem in Abb. 3 wiedergegebenen Versuch zur Geltung gekommen sein, wo bei einer durchaus nicht besonders hohen HEINZ-Körperzahl, im Mittel 30%, unter Ausbleiben einer Retikulozytenvermehrung die Blutfarbstoffkonzentration äußerst schnell abnahm. Wahrscheinlich wirkt das m-Dinitrobenzol unmittelbar auf das Knochenmark, was bei einem Benzolderivat nicht überraschen würde. Es wäre aber auch denkbar, daß die Wirkung mittelbar über das Zentralnervensystem erfolgt, wo sich ja starke Wirkungen nachweisen lassen. Einflüsse des Zentralnervensystems auf die Blutbildung sind auf verschiedenen Wegen nachgewiesen worden (HEILMEYER[1]).

Die histologischen Untersuchungen der Organe der mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tiere zeigten in der Leber Veränderungen in der Struktur des Organs und der Beschaffenheit der Zellen auf, die als krankhaft zu betrachten sind, so daß eine Schädigung der Leber durch das m-Dinitrobenzol sicher anzunehmen ist. Die morphologischen Veränderungen sind nicht zu messen und eine Beziehung zwischen Dosis und Größe der Wirkung ist noch nicht auffindbar. Es ist auch nicht möglich zu entscheiden, ob diese Veränderungen fortschreiten, solange m-Dinitrobenzol einwirkt oder ob sie einen Gleichgewichtszustand zwischen Wirkung und Reparation darstellen. Ebenso ist der Grad der Funktionsstörung der Leber aus den morphologischen Veränderungen nicht zu erschließen. Die vermehrte Ausscheidung von

[1] HEILMEYER, L.: Handbuch der inneren Medizin, Bd. II, S. 4, Blutkrankheiten. Berlin 1942.

Urobilinogen ist wohl ein Hinweis auf eine gewisse Störung, andere Anzeichen wie Erhöhung des Bilirubingehalts des Blutes waren nicht vorhanden.

Die orale Verabreichung von 1 mg/kg m-Dinitrobenzol entspricht in ihrer Auswirkung etwa der subkutanen Injektion von 0,1 mg/kg. Es wäre möglich, daß dieser Unterschied der Wirksamkeit auf schlechter Resorption des Dinitrobenzols durch den Darm beruhte. Doch wäre dann die schnelle starke Wirkung der täglichen Dosis von 2 mg/kg schwer verständlich. Es ist wohl wahrscheinlicher, daß von dem durch den Darm resorbierten Dinitrobenzol ein Teil (durch Reaktion in der Leber ?) nicht zur Allgemeinwirkung kommt. Wenn die Kapazität dieser Ablenkung beschränkt ist, dann kommt bei Steigerung der Dosis über eine bestimmte Grenze ein verhältnismäßig größerer Teil der Dosis zur Wirkung.

Fräulein WALTRAUT SCHWARTZKOPFF habe ich für ihre zuverlässige Hilfe bei den Versuchen zu danken.

Zusammenfassung.

Bei chronischer Vergiftung von Hunden mit m-Dinitrobenzol durch tägliche Injektion kleiner Dosen wurden gleichartige Wirkungen wie bei der Vergiftung mit großen Dosen beobachtet: Bildung von HEINZ-Körpern, Anämie, Störungen im Zentralnervensystem (Lähmungen, Krämpfe) und Leberschäden. Die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration war sehr gering.

Die Zunahme der HEINZ-Körper und des Hämiglobins erreichte im Laufe der Vergiftung einen mehr minder gleichbleibenden Wert, dessen Größe von der Größe der täglichen m-Dinitrobenzoldosis abhing. Für die Hämiglobinbildung konnte gezeigt werden, daß die Wirkungsausbeute einer bestimmten Menge m-Dinitrobenzol bei Gabe in kleinen Dosen über längere Zeit größer ist als bei einmaliger Gabe.

Die Zeit bis zum Auftreten von Störungen im Zentralnervensystem war umgekehrt proportional der täglichen Dosis m-Dinitrobenzol. Für die Erzeugung dieser Störung wurde immer eine Menge von 10—15 mg/kg m-Dinitrobenzol benötigt, weitgehend unabhängig von der Zeit, über die diese Menge verteilt wurde. Zur Deutung dieser Zusammenhänge wurde angenommen, daß es bei der m-Dinitrobenzolwirkung infolge Überwiegens der Wirkungsgeschwindigkeit über die Reparationsgeschwindigkeit zu einer Anhäufung von Wirkung auch über längere Zeit kommt und daß die Wirkungsausbeute bei kleineren Dosen günstiger ist als bei großen.

Die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration schritt während des ganzen Vergiftungsverlaufs mit einer Geschwindigkeit, die der täglichen

Dosis m-Dinitrobenzol im Bereich von 0,2—2,0 mg/kg umgekehrt proportional war, so daß nach Einverleibung einer bestimmten Menge m-Dinitrobenzol jeweils fast die gleiche Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration erzielt war. Zum Zeitpunkt des Eintritts nervöser Störungen betrug die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration 25—35% des Ausgangswertes. Die fortschreitende Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration auf einen mehr minder gleichbleibenden Wert machte es wahrscheinlich, daß die Schädigung der roten Zellen nicht die alleinige Ursache für die Entstehung der Anämie ist, und daß unmittelbare oder mittelbare Wirkungen auf das Knochenmark daran beteiligt sind. Schädigungen der Leber waren morphologisch nachweisbar in Strukturveränderungen, Atrophie, Nekrose, Verfettung und Trübung sowie Hämosiderose. Stärkere Funktionsstörungen wurden nicht beobachtet.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol.

IV. Mitteilung.

Leberfunktionsprüfungen durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure.

Von

Manfred Kiese und Gesche Siems.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Februar 1947.)

Sowohl nach der einmaligen Wirkung großer Dosen[1], wie der über viele Tage wiederholten Wirkung kleiner Dosen von m-Dinitrobenzol[2] waren Veränderungen der Form und Funktion der Leberzellen beobachtet worden. Wir haben versucht, diese Leberfunktionsstörungen genauer zu bestimmen und besonders den Beginn einer Leberschädigung zu erfassen und zogen dazu die Bestimmung der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure heran. Felix und Teske[3] hatten beobachtet, daß der Abbau von p-Oxyphenylbrenztraubensäure eine spezifische Funktion der Leber ist, und haben diese Reaktion als Leberfunktionsprüfung angewandt. Untersuchungen am Menschen haben gezeigt, daß in einem großen Prozentsatz von Lebererkrankungen, insbesondere bei cirrhotischen Veränderungen, die Ausscheidung zugeführter p-Oxyphenylbrenztraubensäure eindeutig vermehrt ist[3, 4, 5].

Unsere Versuche an Hunden und Ratten führten nicht zu gleichen Ergebnissen wie die Untersuchungen von Felix am Menschen. Die Beurteilung wird besonders bei den Versuchen an Hunden durch die Streuung der Ausscheidung bei normalen Tieren erschwert. Bei 30 Messungen ergab sich eine unregelmäßige Verteilung über einen breiten Bereich, während an normalen Ratten eine Anhäufung der Werte um das Mittel auftrat. Am gleichen Tier ist die Streuung offenbar geringer, es bedarf aber einer Mehrzahl von Untersuchungen im Laufe eines Versuchs, um überhaupt Aussagen über Änderung der Ausscheidung zu ermöglichen. Wir beobachteten sowohl nach akuten Vergiftungen mit großen Dosen m-Dinitrobenzol wie nach chronischer mit kleinen Dosen Veränderungen der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, doch trat häufiger eine Abnahme der Ausscheidung als eine Zunahme ein. Diese wurde nur vereinzelt und vorübergehend beobachtet, obwohl bei den meisten Tieren nach Beendigung der Ver-

[1] Kiese, M.: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 361 (1949). — [2] Kiese, M.: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 505 (1949). — [3] Felix, K. u. R. Teske: Z. physiol. Chem. **267**, 173 (1941). — [4] Felix, K.: Z. physiol. Chem. **281**, 36 (1944). — [5] Emmrich, K.: Z. exper. Med. **109**, 604 (1941); **110**, 667 (1942).

suche Leberschädigungen morphologisch nachweisbar waren. Aber auch nach der Wirkung eines so „typischen Lebergiftes" wie Phosphor, die unter starken Veränderungen der Leber die Tiere tötete, wurden nicht regelmäßig Vermehrungen der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure beobachtet. Ein Anstieg der Ausscheidung auf einen einwandfrei übernormalen Wert wurde bei 30 Untersuchungen an 3 Hunden und 3 Ratten überhaupt nur einmal bei einem Hunde gefunden. Bei Untersuchungen über die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Vergiftung mit Trinitrotoluol, über die wir demnächst berichten werden, wurde ebenfalls Verminderung und nur selten unter bestimmten Bedingungen Vermehrung gefunden.

Die Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure erfolgte im allgemeinen innerhalb 24 Stunden nach der Eingabe. Gelegentlich wurde aber noch am zweiten Tage p-Oxyphenylbrenztraubensäure ausgeschieden. Nur selten wurde eine langsame Ausscheidung bei normalen Tieren beobachtet, öfter nach der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol und relativ am häufigsten nach der Vergiftung mit Phosphor. Aber die Verlangsamung der Ausscheidung war keineswegs regelmäßig und stand auch nicht in Beziehung zur Größe der Ausscheidung.

Die Verminderung der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure ist wahrscheinlich auf eine Änderung der Leberfunktion zurückzuführen, doch erscheint es problematisch, ob man diese als „Schädigung" bezeichnen darf. Es scheinen hier ähnliche Verhältnisse vorzuliegen wie bei der Quecksilberwirkung auf die Niere. Kleine Dosen von Quecksilber vermehren die Harnausscheidung, während größere Dosen die Funktion stark schädigen. Bei der doppelsinnigen Reaktionsmöglichkeit der Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure ist eine sichere Erfassung der geringen Leberschädigungen, die durch die Wirkung des m-Dinitrobenzols verursacht werden können, mit dieser Reaktion bei Hund und Ratte nicht möglich. Die Versuche dürften jedoch andere Beobachtungen bestätigen, daß nämlich dem m-Dinitrobenzol eine Wirkung auf die Leber zukommt. Das Versagen der Leberfunktionsprüfung mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei der Phosphorvergiftung weist darauf hin, daß diese bei anderen Vergiftungen von Ratten und Hunden noch weniger als bei der m-Dinitrobenzolvergiftung geeignet ist, Schädigungen der Leberzellen nachzuweisen oder gar quantitativ zu erfassen.

An einer Reihe von Ratten, die etwa 3 Monate lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan erhalten hatten, wurden Leberfunktionsprüfungen durch Bestimmung der Ausscheidung von Galaktose durchgeführt. Sowohl nach Gabe von großen wie kleinen Mengen von Galaktose schieden die vergifteten Tiere den gleichen Anteil aus wie normale. Die Lebern der Tiere wiesen die gleichen histologischen Veränderungen auf, die aus unsern anderen Untersuchungen bekannt sind.

Versuche.

1. Methodik.

Die Untersuchungen wurden an Ratten von 200—300 g und Hunden von 8—12 kg durchgeführt. Die Ratten wurden abwechselnd mit reinem Hafer und mit Mischfutter (Gersten-, Weizen- und Roggenbruch sowie Rübsamen) ernährt, die Hunde mit aus Teigwarenabfällen bzw. Graupen oder Haferflocken mit Kartoffeln, Brot, Fleisch und Knochen zusammengekochtem Futter. m-Dinitrobenzol wurde in Mohnöl gelöst injiziert.

Zur Leberfunktionsprüfung mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde der Urin der Tiere im Stoffwechselkäfig in 12-Stundenmengen gesammelt und 1—3 Tage lang die Normalausscheidung von Stoffen, die die Millon-Reaktion geben („normale Millon-Stoffe"), bestimmt. Dann erhielten Ratten 0,15 oder 0,2 g und Hunde 2,0 g p-Oxyphenylbrenztraubensäure in Mehlbrei mit der Schlundsonde in den Magen. Die Ausscheidung von Millon-Stoffen wurde danach wiederum mehrere Tage lang bestimmt. Die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure ergab sich als Differenz der Ausscheidung von Millon-Stoffen vor und nach der Verabreichung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure. War die Ausscheidung am zweiten Tage noch größer als 10% der Ausscheidung am ersten Tag wurde dieser Betrag noch zur Ausscheidung dazugerechnet.

Die quantitative Bestimmung der Millon-Stoffe erfolgte grundsätzlich nach den von Felix und Teske[3] gegebenen Vorschriften. Doch wurde die Bestimmung des roten Farbstoffs im Photometer von Havemann[6] unter Verwendung der Filter GG 11 und BG 7 durchgeführt. Die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens machte eine Verminderung der zur Analyse verwandten Harnmengen erforderlich. Vom Hundeharn wurden nur 0,5 ml und vom Rattenharn nur 0,25 ml verwendet. Die übrigen Reagenzien wurden in den von Felix und Teske angegebenen Mengen verwendet. Eine Fraktionierung des Harns wurde nicht vorgenommen.

Infolge der kleinen Urinmengen konnten in den Lösungen keine Natriumchloridkonzentrationen auftreten, die die mit dem Millon-Reagenz gebildete Farbe beeinträchtigten. In Übereinstimmung mit Emmrich[5] fanden wir, daß hohe Natriumchloridkonzentrationen die Bildung des Farbstoffs mit dem Millon-Reagenz hemmen. Bei Verwendung von 0,5 ml Urin mit einem (künstlich hergestellten) Natriumchloridgehalt von 3% wurde noch keine Änderung der Farbe gegenüber einem Natriumchloridgehalt von 0,7% beobachtet. In Gegenwart von 5% NaCl im Urin wurde jedoch die p-Oxyphenylbrenztrauben-

[6] Havemann, R.: Biochem. Z. **301**, 105 (1939); **306**, 224 (1940); **310**, 378 (1942)

säurekonzentration um 5%, bei 10% NaCl im Urin um 20% zu niedrig gefunden. Bei Verwendung von 2,5 ml Urin werden in der Analysenflüssigkeit öfter NaCl-Konzentrationen erreicht, die bereits die Farbbildung beeinträchtigen. Die Anwendung kleiner Urinmengen hat ferner den Vorzug, daß die Eigenfarbe der Reaktionslösung (vor Zusatz von Nitrit) so gering ist, daß sie vernachlässigt werden kann, falls der Harn nicht irgendwelche besonderen Farbstoffe enthält. Um den Einfluß anderer unbekannter Harnbestandteile auf die Farbbildung weitgehend auszuschalten, wurde die Eichkurve mit einer Lösung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure in Harn hergestellt.

Bei jedem Versuchstier wurden vor der Vergiftung 2—3 Belastungen mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure durchgeführt und dann im Verlaufe der Vergiftung in wechselnden Zeitabständen weitere Belastungen.

Die Tiere wurden teils täglich mit kleinen Dosen (chronische Vergiftung), teils in größeren Zeitabständen mit jeweils einmaligen großen Dosen vergiftet (wiederholte akute Vergiftung).

Zur Darstellung der Ergebnisse in den Kurven ist zu bemerken, daß der eingetragene Wert der Ausscheidung von physiologischen Millon-Stoffen wie von p-Oxyphenylbrenztraubensäure die Ausscheidungen in den vorhergehenden 24 Stunden bezeichnet.

2. Ausscheidung von normalen Millon-*Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure vor der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol bei Hunden und Ratten.*

Hunde sowohl wie Ratten scheiden auch ohne Eingabe von p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Urin Stoffe aus, die eine Millon-Reaktion geben. Ihre Menge schwankt und ist bei der Bestimmung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure zu berücksichtigen. Berechnet als p-Oxyphenylbrenztraubensäure betrug diese Ausscheidung bei Hunden vor der Eingabe von p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Mittel von 92 Messungen 156 mg je Tag. Die Streuung der Einzelwerte betrug 59 mg, die des Mittelwertes 6,1 mg. Nach Eingabe von 20 g p-Oxyphenylbrenztraubensäure per os wurden von den Hunden vor der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol in 30 Versuchen im Mittel 408 mg im Urin wieder ausgeschieden. Die Werte waren sehr unregelmäßig verteilt und zeigten keine Annäherung an eine Normalverteilung (Tabelle 1). Um eine Beurteilung der Änderung der Ausscheidung nach der Vergiftung zu ermöglichen, haben wir trotzdem die Streuung berechnet. Sie betrug für die Einzelwerte 178 mg, für den Mittelwert also 32,5 mg. Die Ausscheidung war meist in 24 Stunden beendet.

Bei Ratten betrug die Ausscheidung von Millon-Stoffen, berechnet als p-Oxyphenylbrenztraubensäure ohne Zufuhr von p-Oxyphenylbrenztraubensäure in 182 Untersuchungen im Mittel 3,3 mg je Tag.

Die Streuung der Einzelwerte betrug 1,37 mg, die des Mittelwerts also 0,1 mg. Von 150 mg p-Oxyphenylbrenztraubensäure schieden Ratten vor der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol in 67 Untersuchungen im Mittel 34,9 mg im Urin wieder aus. Die Verteilung der Einzelwerte der Ratten zeigt eine größere Gesetzmäßigkeit als die der Hunde und weist eine eindeutige Anhäufung um das Mittel auf (Tabelle 1). Die Streuung der Einzelwerte betrug 8,1 mg, die des Mittelwerts 1,0 mg.

Tabelle 1. *Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei normalen Hunden nach Eingabe von 2,0 g und normalen Ratten nach Eingabe von 150 mg.*

Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure mg	Zahl der Untersuchungsergebnisse	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure mg	Zahl der Untersuchungsergebnisse
A. Hunde.		B. Ratten.	
150—200	4	10—15	1
200—250	4	15—20	3
250—300	3	20—25	5
300—350	3	25—30	8
350—400	1	30—35	17
400—450	3	35—40	14
450—500	2	40—45	14
500—550	5	45—50	3
550—600	0	50—55	2
600—650	0		67
650—700	3		
700—750	2		
	30		

Sowohl die Ausscheidung normaler Millon-Stoffe wie der p-Oxyphenylbrenztraubensäure unterliegt einer erheblichen Streuung, was die Beurteilung des einzelnen Versuchs erschwert. Jedoch ist die Ausscheidung beim gleichen Tier nicht so starken Schwankungen unterworfen. Durch Untersuchung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure-Ausscheidung jeden Tieres vor der Vergiftung wird also die Beurteilung erleichtert, die Durchführung der Versuche aber kompliziert.

3. Akute Vergiftungen von Hunden mit m-Dinitrobenzol.

Wiederholte Vergiftungen mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol in Abständen von 4—6 Wochen wurden an 2 Hunden durchgeführt. Ein Hund starb nach der dritten Vergiftung, der andere überlebte 4 Vergiftungen.

Der Verlauf eines Versuches ist in Abb. 1 wiedergegeben. Nach der ersten Vergiftung stieg die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure zunächst stark an auf 1300 mg, um danach auf sehr niedrige Werte von 150 mg abzusinken. Auf die folgenden Vergiftungen folgte

jedesmal eine geringe Steigerung der Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure, die aber nie übernormale Werte erreichte, und danach wieder ein Absinken auf unternormale Werte. Beim zweiten Hund stieg die Ausscheidung nach der ersten Vergiftung im Laufe von 10 Tagen von 480 mg auf 900 mg an, kehrte nach weiteren 10 Tagen wieder in die Nähe des Ausgangswertes zurück und sank nach der

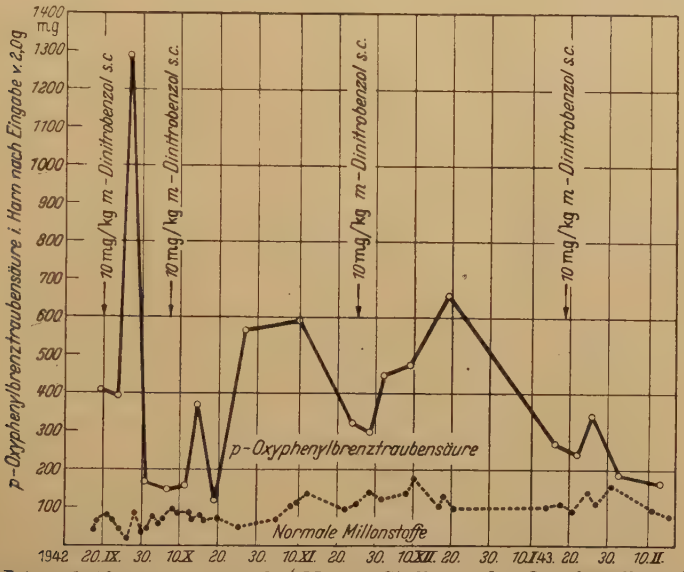


Abb. 1. Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach wiederholter Vergiftung eines Hundes mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol. — Hund G. S. 6, 7,0 kg. m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subkutan injiziert. — Nach der Eingabe von p-Oxyphenylbrenztraubensäure am 3. 12. dauerte die Ausscheidung länger als 24 Stunden.

zweiten Vergiftung, die 4 Wochen nach der ersten durchgeführt wurde auf 275 mg ab.

Die Ausscheidung der normalen MILLON-Stoffe änderte sich bei beiden Tieren nach der Vergiftung nicht.

4. Chronische Vergiftungen von Hunden mit m-Dinitrobenzol.

Vier Hunden wurden täglich 1,5 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst subkutan injiziert, nachdem vorher die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure geprüft war. Die Injektionen von m-Dinitrobenzol wurden unterbrochen, sobald stärkere zentrale Störungen eintraten, die erfahrungsgemäß den bevorstehenden Tod des Tieres ankündigten, wenn die Injektion von m-Dinitrobenzol fortgesetzt wurde. Die Änderung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure-Ausscheidung während der Wirkung des m-Dinitrobenzols ist in Abb. 2 für einen Hund

kurvenmäßig dargestellt. Die Daten der anderen Versuchstiere sind in Tabelle 2 enthalten. Nur bei einem Hunde (GS 4) wurde kurz vor dem Tode, 6 Wochen nach Beginn der Vergiftung, eine über die Norm erhöhte Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure beobachtet. In den anderen Versuchen traten Abnahmen der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure ein, die jedoch nicht konstant blieben. In dem in Abb. 2 wiedergegebenen Versuch sank die Ausscheidung

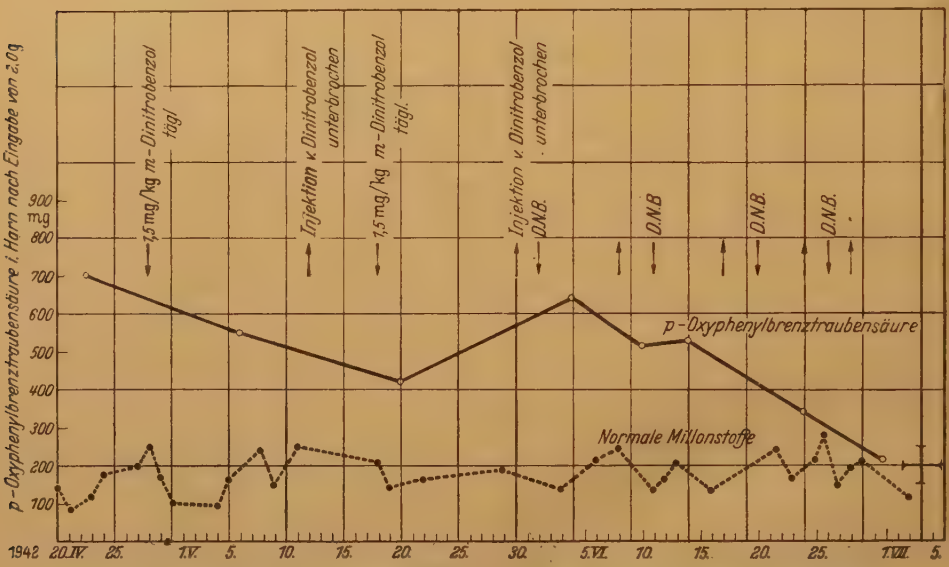


Abb. 2. Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei chronischer Vergiftung eines Hundes mit m-Dinitrobenzol. — Hund G. S. 2, 17,6 kg. m-Dinitrobenzol in Öl gelöst subkutan injiziert. — Am 4. 6. dauerte die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure länger als 24 Stunden.

von p-Oxyphenylbrenztraubensäure erst kurz vor dem Tode auf einen niedrigen Wert. Bei den beiden anderen Hunden (GS 3 und GS 5) trat die Verminderung der Ausscheidung bald nach Beginn der Vergiftung ein. Danach stieg die Ausscheidung wieder an und war beim Tode im Bereich normaler Werte.

Die Ausscheidung normaler MILLON-Stoffe zeigte auch in diesen Versuchen keine wesentlichen Änderungen.

5. Akute Vergiftungen von Ratten mit m-Dinitrobenzol.

Zur akuten Vergiftung mit m-Dinitrobenzol wurden den Ratten 30 mg/kg m-Dinitrobenzol in Mohnöl gelöst intraperitoneal injiziert. Die erste Dosis überlebten alle Tiere. Bei 3 der 5 Tiere traten mehrere Stunden nach der Injektion vorübergehend Krämpfe auf. Die anderen

Tabelle 2. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 2,0 g p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Hunden während chronischer Vergiftung mit 1,5 mg/kg m-Dinitrobenzol täglich.*

Hund	Datum	Normale MILLON-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 2,0 g mg	Bemerkungen
GS 3	17. 4. 42	105		
12,7 kg	18. 4. 42		550	
	20. 4. 42	55		
	21. 4. 42	95		
	22. 4. 42		650	Ausscheidung noch am 2. Tag
	27. 4. 42	150		
	28. 4. 42			Beginn der Injektion von m-Dinitrobenzol 1,5 mg/kg je Tag
	29. 4. 42	105		
	30. 4. 42	100		
	1. 5. 42	105		
	4. 5. 42		250	
	6. 5. 42	125		
	7. 5. 42		205	
	11. 5. 42	155		
	19. 5. 42	170		
	20. 5. 42		350	Injektion von m-Dinitrobenzol unterbrochen
	27. 5. 42			Hund nach mehrtägigen Krämpfen gestorben
GS 4	1. 6. 42	85		
9,5 kg	2. 6. 42	100		
	3. 6. 42		450	
	6. 6. 42		550	Beginn der Injektion von m-Dinitrobenzol 1,5 mg/kg je Tag
	8. 6. 42	120		
	9. 6. 42	120		
	10. 6. 42		400	
	12. 6. 42	110		
	13. 6. 42	130		
	14. 6. 42		380	
	16. 6. 42	180		
	22. 6. 42	220		
	23. 6. 42	100		
	24. 6. 42		580	
	26. 6. 42			Injektion von m-Dinitrobenzol wegen schlechten Allgemeinzustandes unterbrochen
	27. 6. 42	95		
	29. 6. 42	110		Injektionen fortgesetzt
	30. 6. 42	175		
	31. 6. 42		400	
	4. 7. 42			Injektion unterbrochen, Krämpfe
	7. 7. 42	125		Injektionen fortgesetzt
	8. 7. 42	95		Injektionen unterbrochen, Krämpfe
	9. 7. 42		350	Ausscheidung noch am 2. Tag
	12. 7. 42	160		

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Hund	Datum	Normale Millon-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 2,0 g mg	Bemerkungen
	16. 7. 42		1080	
	19. 7. 42	115		
	20. 7. 42			Tod
GS 5	6. 7. 42	135		
14,0 kg	7. 7. 42	150		
	8. 7. 42		530	
	10. 7. 42	190		
	11. 7. 42			Beginn der Injektion von m-Dinitrobenzol 1,5 mg/kg je Tag
	19. 7. 42	200		
	20. 7. 42	225		
	21. 7. 42		160	
	24. 7. 42	210		
	25. 7. 42	190		
	26. 7. 42		220	
	29. 7. 42	150		
	30. 7. 42	160		Injektionen unterbrochen, Lähmungen
	31. 7. 42		400	Krämpfe
	4. 8. 42	140		
	5. 8. 42		390	
	8. 8. 42	100		
	9. 8. 42	110		
	10. 8. 42		475	Ausscheidung noch am 2. Tag
	12. 8. 42			Tod

Tiere waren nur ruhiger und hatten leichte Lähmungen der hinteren Extremitäten. Vier Stunden nach der Injektion des m-Dinitrobenzols war durch Herzpunktion Blut entnommen worden. Der Hämiglobingehalt betrug 40—60% des Gesamtblutfarbstoffs.

Die Vergiftung wurde nach 2—4 Wochen wiederholt und konnte bei einem Tier noch ein drittes Mal durchgeführt werden, allerdings mit tödlichem Erfolg 4 Stunden nach der Injektion.

Die schon bei den Versuchen mit Hunden beobachtete Verminderung der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol trat besonders klar in den Versuchen mit der Ratte GS 8 (Abb. 3) hervor, wo nach der ersten Injektion im Laufe von 6 Tagen die Ausscheidung von 38 mg auf 18,5 mg abnahm, in 2 Wochen wieder auf den Ausgangswert zurückkehrte und nach erneuter Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol in etwa der gleichen Weise abfiel, um danach wieder anzusteigen. Durch die dritte Injektion wurde das Tier leider schnell getötet.

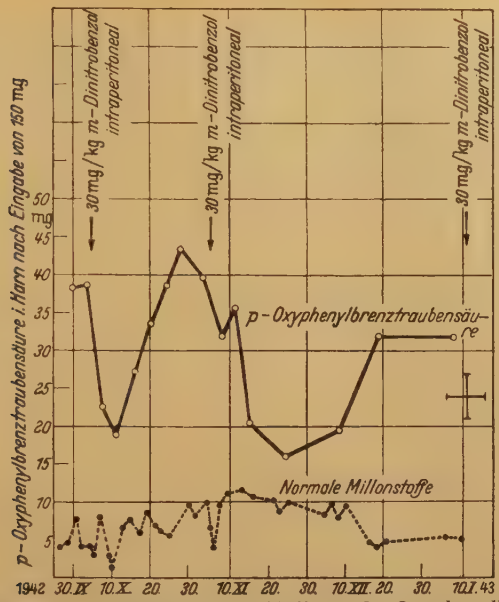


Abb. 3. Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach wiederholter Vergiftung einer Ratte mit 30 mg/kg m-Dinitrobenzol. Ratte G. S. 8. 360 g.

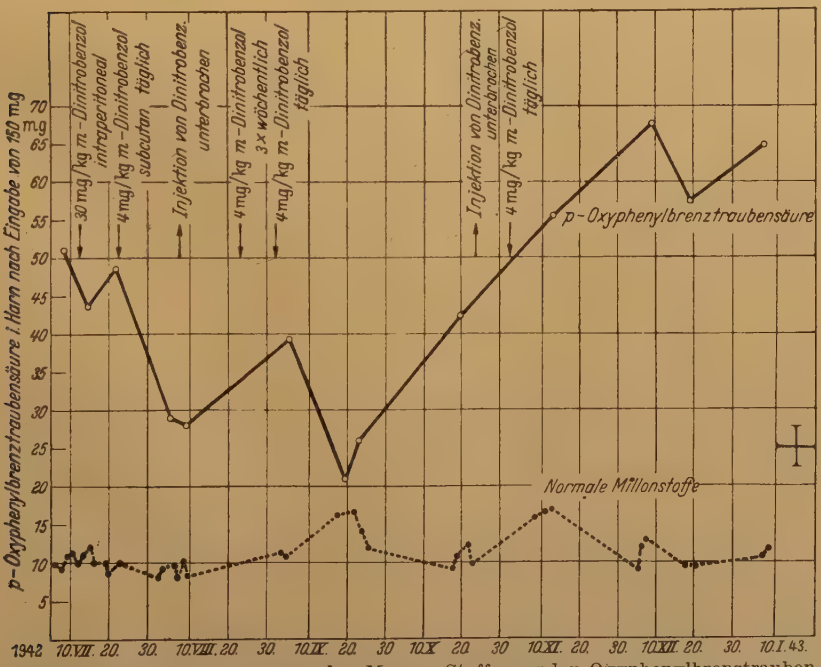


Abb. 4. Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei chronischer Vergiftung einer Ratte mit m-Dinitrobenzol. — Ratte G. S. 5. 313 g.

Tabelle 3. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 150 mg p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Ratten nach akuter Vergiftung mit 30 mg/kg m-Dinitrobenzol.*

Ratte	Datum	Normale MILLON-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
GS 6	19. 7. 42	6,0		
180 g	20. 7. 42		30,5	
	22. 7. 42	8,5		
	23. 7. 42		36,5	
	24. 7. 42	5,5		Intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol
	25. 7. 42		29,0	
	27. 7. 42	5,0		
	29. 7. 42	5,5		
	30. 7. 42		70,5	
	2. 8. 42	3,5		
	3. 8. 42		48,0	
	6. 8. 42	4,0		
	7. 8. 42	5,0		
	9. 8. 42	6,5		
	10. 8. 42		39,0	
	2. 9. 42	2,5		
	3. 9. 42	3,5		
	5. 9. 42		57,5	
GS 2	19. 7. 42	5,0		
337 g	20. 7. 42		17,5	
	22. 7. 42	6,0		
	23. 7. 42		20,0	
	24. 7. 42			Intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol
	25. 7. 42		21,5	
	27. 7. 42	5,5		
	29. 7. 42	3,5		
	30. 7. 42		8,0	
	2. 8. 42	3,5		
	3. 8. 42	4,0		
	4. 8. 42		10,0	
	5. 8. 42			Intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol
	6. 8. 42	2,5		
	8. 8. 42	3,5		
	9. 8. 42	4,5		
	10. 8. 42		10,0	
GS 7	17. 9. 42	3,5		
285 g	18. 9. 42	3,0		
	19. 9. 42		24,5	
	21. 9. 42	4,0		
	22. 9. 42	3,5		
	23. 9. 42		17,0	
	25. 9. 42	4,5		
	28. 9. 42	4,5		Intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol
	30. 9. 42		26,0	
	2. 10. 42	4,0		

Tabelle 3. (Fortsetzung.)

Ratte	Datum	Normale Millon-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
	3. 10. 42	4,0		
	4. 10. 42		24,0	
	7. 10. 42	3,0		
	8. 10. 42	5,5		
	9. 10. 42		19,0	
	14. 10. 42	3,0		Intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol
	15. 10. 42	2,0		
	17. 10. 42		19,5	
GS 9	29. 9. 42	5,0		
350 g	30. 9. 42	6,0		
	2. 10. 42		30,0	
	23. 10. 42	5,0		
	24. 10. 42	3,0		
	26. 10. 42	4,0		
	27. 10. 42		38,0	
	30. 10. 42	7,0		
	31. 10. 42		30,0	
	3. 11. 42	4,5		Intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg m-Dinitrobenzol
	6. 11. 42		33,0	
	8. 11. 42	6,0		
	9. 11. 42		32,5	
	15. 11. 42	4,5		
	17. 11. 42		37,5	

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den anderen 4 Ratten sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Bei einer Ratte (GS 2) wurde ebenfalls eine Abnahme der Ausscheidung auf unternormale Werte beobachtet (von 22 auf 8 mg). Zwei Tiere änderten die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach der Vergiftung nicht und nur bei einem Tier (GS 6) stieg die Ausscheidung nach der Vergiftung auf einen übernormalen Wert, von 29,0 auf 70,5 mg.

In einigen Versuchen sank die Ausscheidung normaler Millon-Stoffe nach der Injektion vorübergehend auf ungewöhnlich niedrige Werte ab. Ob diese Veränderung im gleichen Sinne zu verstehen ist wie die Abnahme der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, ist nicht zu entscheiden.

6. Chronische Vergiftungen von Ratten mit m-Dinitrobenzol.

Zwei Ratten wurden nach einer Vergiftung mit einer großen Dosis m-Dinitrobenzol (30 mg/kg) ein halbes Jahr lang mit kleinen Dosen m-Dinitrobenzol vergiftet, und zwar zeitweise täglich mit 4 mg/kg,

zeitweise dreimal wöchentlich mit 4 mg/kg. Beim Auftreten leichter Störungen (hohen steifen Gangs, Übererregbarkeit, schlechten Fressens) wurde die Vergiftung fortgesetzt und erst unterbrochen, wenn Seitenlage und Krämpfe eintraten. Nach Besserung wurde die Vergiftung wieder fortgesetzt. Beide Tiere erhielten zur Prüfung des p-Oxyphenylbrenztraubensäure-Abbaus nicht 150 mg p-Oxyphenylbrenztraubensäure wie die vorigen, sondern 200 mg. Die Ausscheidung normaler Tiere betrug nach dieser Dosis im Mittel 42 mg.

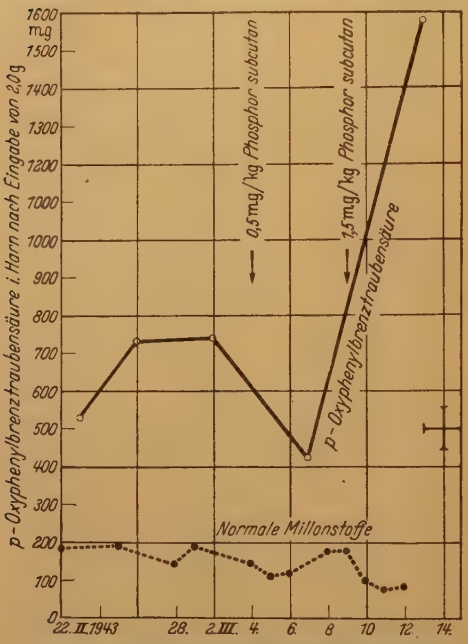


Abb. 5. Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Phosphorvergiftung eines Hundes. — Hund G. S. 11, 9,3 kg. — Am 7. 3. und 13. 3. dauerte die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure länger als 24 Stunden.

Die Änderung der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei einem Tier ist aus der Kurve der Abb. 4 ersichtlich. Die Daten des anderen Tieres sind in Tabelle 4 enthalten. Bei beiden Tieren nahm die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Laufe der ersten 8 Wochen ab und erreichte unternormale Werte von 15 mg. Danach stieg die Ausscheidung bei der Ratte GS 5 (Abb. 4) wieder an und erreichte die obere Grenze normaler Ausscheidung. Die andere Ratte (Tabelle 4) schied nach vorübergehender Zunahme der Ausscheidung kurz vor dem Tode wieder nur geringe Mengen von p-Oxyphenyl-brenztraubensäure aus.

Die Ausscheidung normaler MILLON-Stoffe änderte sich auch bei der chronischen Vergiftung der Ratten nicht.

7. Vergiftung von Hunden und Ratten mit Phosphor.

Um zu prüfen, wie die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Hunden und Ratten überhaupt durch eine sichere Leberschädigung verändert wird, wurden 3 Hunde und 3 Ratten wiederholt mit Phosphor vergiftet, bis sie dadurch getötet wurden. Bei der ersten Vergiftung erhielten die Hunde 0,5 mg/kg Phosphor in Öl gelöst subkutan; für die folgenden Vergiftungen wurde die Dosis auf 1,0 bzw.

Tabelle 4. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei der Ratte G.S. 4, 205 g nach Eingabe von 200 mg p-Oxyphenylbrenztraubensäure während chronischer Vergiftung mit m-Dinitrobenzol.*

Datum	Normale MILLON-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 200 mg mg	Bemerkungen
4. 7. 42	5,0		
5. 7. 42		37,0	
7. 7. 42	6,0		
8. 7. 42		42,5	
10. 7. 42	6,5		30 mg/kg m-Dinitrobenzol intraperitoneal
12. 7. 42	6,0		
13. 7. 42	4,0		
15. 7. 42		47,5	
19. 7. 42	6,5		
20. 7. 42		42,0	Täglich 4 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan
29. 7. 42	5,0		
30. 7. 42		34,0	
3. 8. 42	4,5		
5. 8. 42		20,0	
10. 8. 42			3mal wöchentlich 4 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan
30. 8. 42	3,0		
3. 9. 42	3,5		Täglich 4 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan
4. 9. 42	3,0		
5. 9. 42		24,0	Injektionen von m-Dinitrobenzol unterbrochen
16. 9. 42	3,5		
18. 9. 42	4,5		
20. 9. 42		14,5	
24. 9. 42	5,0		
25. 9. 42		16,0	
27. 9. 42			Täglich 4 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan
11. 10. 42	4,0		
12. 10. 42	5,0		
14. 10. 42		27,0	Ausscheidung noch am 2. Tag
11. 11. 42	7,5		
13. 11. 42	8,0		
14. 11. 42		34,5	
29. 11. 42	4,0		
30. 11. 42	4,5		
1. 12. 42		22,0	
18. 12. 42	4,5		
20. 12. 42		18,0	
22. 12. 42			Tod

1,5 und 2,0 mg gesteigert. Die Ratten erhielten zunächst mehrmals 4,0 mg/kg, danach 6,0 bzw. 8,0 mg/kg.

Ein Anstieg der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure auf übernormale Werte wurde nur bei einem Hunde beobachtet.

Tabelle 5. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Hunden nach Eingabe von 2,0 g p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach wiederholter Vergiftung mit Phosphor.*

Hund	Datum	Normale MILLON-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 2,0 g mg	Bemerkungen
GS 9	17. 1. 43	210		
12,5 kg	18. 1. 43		250	
	19. 1. 43	130		
	20. 1. 43		275	
	22. 1. 43	110		
	23. 1. 43		295	
	25. 1. 43	155		0,5 mg/kg Phosphor subkutan
	28. 1. 43	110		
	29. 1. 43		225	
	1. 2. 43	95		
	2. 2. 43		405	Ausscheidung noch am 2. Tag 1,0 mg/kg Phosphor subkutan
	5. 2. 43	95		
	8. 2. 43	80		
	9. 2. 43		575	
	12. 2. 43	90		
	13. 2. 43		330	
	16. 2. 43			2,0 mg/kg Phosphor subkutan
	17. 2. 43			Tod
GS 14	10. 9. 42	100		
13,5 kg	11. 9. 42		380	
	21. 9. 42	140		
	22. 9. 42		425	Ausscheidung noch am 2. Tag
	29. 9. 42	105		
	30. 9. 42		460	
	2. 10. 42			0,5 mg/kg Phosphor subkutan
	5. 10. 42	100		
	6. 10. 42		350	
	9. 10. 42			0,5 mg/kg Phosphor subkutan
	11. 10. 42	110		
	12. 10. 42		305	
	14. 10. 42			0,5 mg/kg Phosphor subkutan
	17. 10. 42	150		
	18. 10. 42		695	Ausscheidung noch am 2. Tag
	20. 10. 42			1,0 mg/kg Phosphor subkutan
	22. 10. 42	100		
	23. 10. 42	110		
	24. 10. 42		650	Ausscheidung noch am 2. Tag
	26. 10. 42			Tod

Nach der ersten Injektion von Phosphor (0,5 mg/kg) sank die Ausscheidung ab und stieg nach der zweiten Injektion (1,5 mg/kg) unmittelbar vor dem Tode des Tieres auf 1580 mg an (Abb. 5). Bei den anderen Hunden, deren Ausscheidung vor und im Beginn der Vergiftung schwankte, erfolgten auch Anstiege, die aber nicht über den Bereich der Streuung hinausgingen (Tabelle 5).

Tabelle 6. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Ratten nach Eingabe von 150 mg p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach wiederholter Vergiftung mit Phosphor.*

Ratte	Datum	Normale MILLON-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
GS 23	26. 2. 43	5,0		
	27. 2. 43		33	
	29. 2. 43	3,5		
	1. 3. 43		31	
	6. 3. 43	4,0		
	7. 3. 43		36	
	10. 3. 43	5,0		4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	17. 3. 43	3,0		
	18. 3. 43		21	
	23. 3. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	26. 3. 43	2,0		
	27. 3. 43		19	
	1. 4. 43	3,0		
	2. 4. 43		20	
	4. 4. 43	3,0		4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	7. 4. 43	3,0		
	8. 4. 43		28	
	13. 4. 43	3,0		
	14. 4. 43		31	
	17. 4. 43			8,0 mg/kg Phosphor subkutan
	20. 4. 43	3,0		
	21. 4. 43		23	
	24. 4. 43			Tod
GS 24	28. 2. 43	2,5		
	1. 3. 43		30	
	12. 3. 43	2,0		
	13. 3. 43		24	
	19. 3. 43	2,0		
	20. 3. 43		34	
	24. 3. 43	2,5		
	25. 3. 43		29	
	27. 3. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	1. 4. 43	3,0		
	2. 4. 43		24	
	5. 4. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	8. 4. 43	3,0		
	9. 4. 43		21	
	12. 4. 43	3,5		
	13. 4. 43		23	
	18. 4. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	22. 4. 43	2,0		
	23. 4. 43		37	
	28. 4. 43			8,0 mg/kg Phosphor subkutan
	2. 5. 43	3,5		
	3. 5. 43		45	
	5. 5. 43			Tod

Tabelle 6. (Fortsetzung).

Ratte	Datum	Normale MILLON-Stoffe im Harn je 24 Stunden mg	p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
GS 28	1. 5. 43	3,0		
	2. 5. 43		39	
	4. 5. 43	5,5		
	5. 5. 43		37	
	10. 5. 43	4,0		
	11. 5. 43		40	
	13. 5. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	16. 5. 43	3,0		
	17. 5. 43		55	
	20. 5. 43	4,5		
	21. 5. 43		36	
	23. 5. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	25. 5. 43	4,5		
	26. 5. 43		35	
	30. 5. 43	4,5		
	31. 5. 43		26	
	4. 6. 43			4,0 mg/kg Phosphor subkutan
	6. 6. 43	5,0		
	7. 6. 43		46	
	10. 6. 43	5,5		
	11. 6. 43		45	
	17. 6. 43			6,0 mg/kg Phosphor subkutan
	19. 6. 43	3,0		
	20. 6. 43		58	
	24. 6. 43	3,5		
	25. 6. 43		47	
	29. 6. 43			6,0 mg/kg Phosphor subkutan
	1. 7. 43	3,5		
	2. 7. 43		40	
	3. 7. 43			Tod

Die p-Oxyphenylbrenztraubensäure-Ausscheidung der Ratten, die in Tabelle 6 wiedergegeben ist, erfuhr durch die Wirkung des Phosphors keine erheblichen Veränderungen. Es traten Zu- und Abnahmen auf, die zwar über den Bereich der Schwankungen am gleichen Tier hinausgingen, die Streuung der Ausscheidung bei verschiedenen Tieren aber nicht überschritten.

Die morphologischen Veränderungen in den Lebern der Tiere waren weit stärker als nach der Vergiftung mit m-Dinitrobenzol. Neben hochgradiger feintropfiger Verfettung der Leber- und Sternzellen wurden starke Dissoziation der Zellen, Atrophie und Nekrosen, sowie Ablösung der Sternzellen gefunden. Bei den Hunden waren die Veränderungen stärker als bei den Ratten.

Zusammenfassung.

Leberfunktionsprüfungen durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurden bei Hunden und Ratten nach akuter und chronischer Vergiftung mit m-Dinitrobenzol durchgeführt. Zunahme der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde nur in wenigen Fällen beobachtet, häufiger dagegen Abnahme auf sehr niedrige oder unternormale Werte. Die Änderungen der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach der Wirkung von m-Dinitrobenzol wurden als ein Hinweis auf einen Einfluß des m-Dinitrobenzols auf die Leberfunktion angenommen in Übereinstimmung mit anderen Beobachtungen, doch war ein sicherer Nachweis oder gar eine quantitative Erfassung von Leberschädigungen — wenigstens bei Hund und Ratte — mit dem Verfahren nicht möglich.

Auch bei Vergiftungen von Hunden und Ratten mit Phosphor, die zu starken Leberschädigungen führten, wurde nur ausnahmsweise eine Zunahme der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure auf übernormale Werte beobachtet.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Leberfunktionsprüfungen bei Vergiftungen mit Trinitrotoluol durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure.

Von

Manfred Kiese und Gesche Siems.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Februar 1947.)

In einer vorhergehenden Mitteilung[1] haben wir über Versuche berichtet, bei Hunden und Ratten nach Vergiftung mit m-Dinitrobenzol Schädigungen der Leber durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nachzuweisen, die Felix und Teske[2] zur Leberfunktionsprüfung empfohlen hatten. Es gelang nicht, die geringen Leberschädigungen, die das m-Dinitrobenzol verursacht, quantitativ zu erfassen oder auch nur in jedem Falle sicher nachzuweisen. Zahlreiche Mitteilungen in der Literatur über Beobachtungen am Menschen und experimentelle Untersuchungen an Tieren zeigen, daß das Trinitrotoluol eine wesentlich stärkere Wirkung auf die Leber besitzt als das m-Dinitrobenzol und Schädigungen bis zur gelben Leberatrophie zu bewirken vermag. Wir haben darum auch bei Hunden und Ratten, die in verschiedener Weise mit Trinitrotoluol vergiftet wurden, Bestimmungen der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe bestimmter Dosen durchgeführt.

Doch konnten auch bei der Trinitrotoluol-Vergiftung von Hunden und Ratten keine befriedigenden Ergebnisse durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure erzielt werden. Weder nach einer einmaligen akuten Vergiftung noch nach chronischer Vergiftung mit Trinitrotoluol trat bei Ratten eine Steigerung der Ausscheidung der Säure ein, obwohl die histologische Untersuchung der Lebern Schädigungen einwandfrei nachwies. Nur nach häufig wiederholten akuten Vergiftungen wurde bei einigen Tieren ein allmählicher Anstieg der Ausscheidung auf übernormale Werte beobachtet. So auffällige Senkungen der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure wie in den Versuchen mit m-Dinitrobenzol wurden nicht beobachtet. Jedoch nahm in 3 Versuchen mit chronischer Anwendung von Trinitrotoluol die Ausscheidung eindeutig auf Werte an der unteren Grenze der Norm ab. Somit bietet auch die Einwirkung von Trinitrotoluol auf die Leber das Bild der doppelsinnigen Änderung der Aus-

[1] Kiese, M. u. G. Siems: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 532 (1949). — [2] Felix, K. u. R. Teske: Z. physiol. Chem. **267**, 173 (1941).

scheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, die dem Verständnis und der Bewertung große Schwierigkeiten bietet und — auch in Anbetracht der Unregelmäßigkeit — eine Beurteilung des Zustandes der Leber nicht zuläßt.

Versuche.

1. Methodik.

Die Versuchsanordnung zur Leberfunktionsprüfung wurde gegenüber den früheren Angaben[1] im Bericht über die Dinitrobenzolvergiftungen nicht verändert. Ratten erhielten 0,15 g und Hunde 2,0 g p-Oxyphenylbrenztraubensäure per os. Bei der photometrischen Bestimmung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Rattenurin nach Verabreichung von Trinitrotoluol mußte für die Rotfärbung des Urins korrigiert werden. Das geschah dadurch, daß jeweils eine Harnprobe durch den Gang der Analyse mitgeführt, aber nicht mit Nitrit versetzt wurde. Diese Lösung wurde zur Einstellung des Leerwertes der Kuvette im Photometer benutzt. Als „p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn" wurden alle Stoffe bezeichnet, die die MILLON-Reaktion geben, nach Abzug der „normalen MILLON-Stoffe", deren Menge an den Tagen vor der Gabe von p-Oxyphenylbrenztraubensäure ermittelt war.

Die Versuche wurden an Hunden und Ratten durchgeführt. Trinitrotoluol wurde in öliger Lösung subkutan oder intraperitoneal injiziert. Es wurden akute Vergiftungen mit großen Dosen, chronische Vergiftungen durch tägliche Verabreichung einer kleinen Dosis und Vergiftungen durch wiederholte Gabe großer Dosen in mehrtägigen Abständen durchgeführt.

2. Akute Vergiftung von Ratten mit Trinitrotoluol.

Leberfunktionsprüfungen bei akuten Trinitrotoluol-Vergiftungen wurden an Ratten durchgeführt. Aus einigen Vorversuchen ergab sich eine Dosis von 150—175 mg/kg, in 2%iger Lösung intraperitoneal verabreicht, als geeignete Dosis, die starke Wirkungen auslöste, das Tier aber nicht tötete. 20—30 Min. nach der Injektion traten starke Erregungen auf, die sich schnell zu Krämpfen steigerten. Die Tiere blieben in Seitenlage und machten Laufbewegungen, die immer wieder von Krampfanfällen unterbrochen wurden. Nach 2—3 Stunden klangen die Erregungen ab. Die Hämiglobinkonzentration im Blute betrug 2 Stunden nach der Injektion 40—50% des Gesamtblutfarbstoffs. p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde 24 Stunden nach dem Trinitrotoluol verabreicht und nochmal nach 3 weiteren Tagen. Die 5 Versuchstiere schieden vor der Vergiftung mit Trinitrotoluol von 150 mg p-Oxyphenylbrenztraubensäure 24—45 mg im Urin aus. Die Ausscheidungen entsprachen der anderer normaler Tiere. Nach der akuten Vergiftung mit Trinitrotoluol war die Ausscheidung nicht eindeutig verändert.

3. Wiederholte akute Vergiftungen von Ratten mit Trinitrotoluol.

Die intraperitoneale Injektion von 150 mg/kg Trinitrotoluol konnte bei Ratten in Abständen von 6—12 Tagen wiederholt werden. Nach mehrmaliger Verabreichung des Trinitrotoluols wurde die Wirkung auf das Zentralnervensystem geringer. Die Dosis konnte dann sogar auf 200 mg/kg erhöht werden. Es gelang uns, 4 Tiere bei dieser Behandlung 6, 13, 16 und 26 Wochen am Leben zu erhalten. Sie wurden zwischen

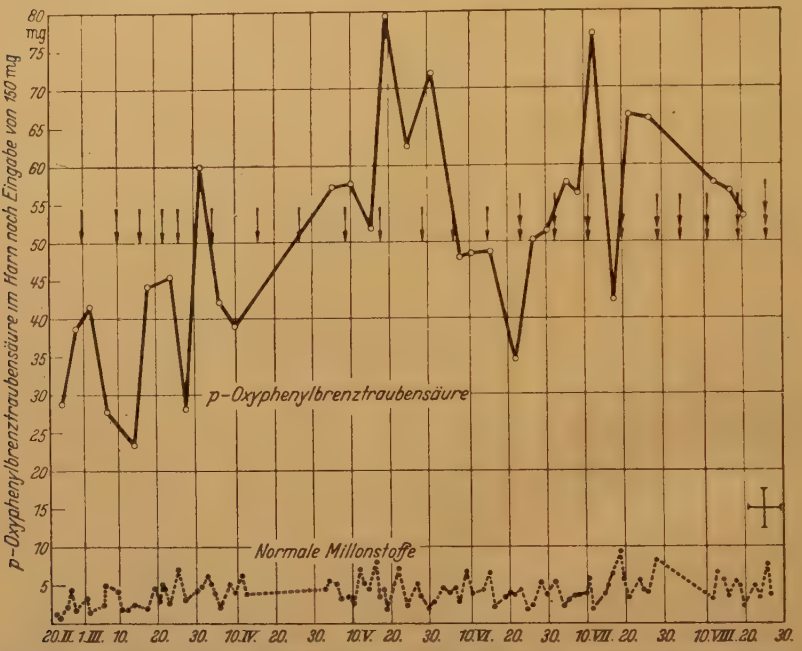


Abb. 1. Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach wiederholten Vergiftungen mit Trinitrotoluol. — Ratte G. S. 14, 150 g. Trinitrotoluol zu 2 % in Öl gelöst intraperitoneal injiziert: bei jedem ↓ 150 mg/kg, bei jedem ↓ 200 mg/kg und beim ↓ 250 mg/kg.

2 Injektionen von Trinitrotoluol durchschnittlich zweimal mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure belastet. Ein Tier starb nach 6 Wochen, ohne daß die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure sich änderte. Ein anderes Tier (Ratte G. S. 15) steigerte unter der immer wiederholten Vergiftung die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure ständig, bis nach 14 Wochen die obere Grenze der Norm überschritten und Ausscheidungen von 60 mg erreicht wurden. Dann ging das Tier bei einer Herzpunktion verloren (s. Tabelle 1). Die Ergebnisse der Untersuchungen an einem dritten Tier, das 26 Wochen lang vergiftet wurde, sind in Abb. 1 wiedergegeben. Die Ausscheidung der

Tabelle 1. *Ausscheidung von normalen* Millon-*Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Ratten nach wiederholter Vergiftung mit großen Dosen von Trinitrotoluol.*

Ratte	Datum	Ausscheidung von normalen Millon-Stoffen im Harn je 24 Stunden mg	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
G.S. 15 270 g	14. 3. 43	3,0		
	15. 3. 43		35	
	17. 3. 43	3,5		
	18. 3. 43		32	
	20. 3. 43	3,0		
	21. 3. 43		39	
	23. 3. 43	2,5		
	24. 3. 43	3,0		150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	25. 3. 43		36	
	28. 3. 43	2,5		
	29. 3. 43	2,5		
	30. 3. 43		34	
	2. 4. 43	3,0		
	3. 4. 43		34	
	6. 4. 43			150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	10. 4. 43	6,0		
	11. 4. 43		29	
	16. 4. 43			150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	27. 4. 43			150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	4. 5. 43	3,0		
	5. 5. 43		43	
	9. 5. 43			150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	10. 5. 43	3,5		
	11. 5. 43		40	
	14. 5. 43	3,0		
	15. 5. 43		40	
	18. 5. 43	6,0		150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	19. 5. 43	3,0		
	20. 5. 43		33	
	24. 5. 43	6,5		
	25. 5. 43		42	
	29. 5. 43			150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	3. 6. 43	4,5		
	4. 6. 43		44	
	8. 6. 43			150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	9. 6. 43	3,0		
	10. 6. 43		48	
	15. 6. 43	4,5		150 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	16. 6. 43	2,5		

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Ratte	Datum	Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen im Harn je 24 Stunden mg	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
	17. 6. 43		63	
	21. 6. 43	4,5		
	22. 6. 43		57	
	24. 6. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	25. 6. 43			bei Herzpunktion getötet
G.S. 20	25. 6. 43	2,5		
160 g	26. 6. 43		38	
	28. 6. 43	2,0		
	29. 6. 43		42	
	1. 7. 43	2,5		
	2. 7. 43		39	
	5. 7. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	12. 7. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	17. 7. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	22. 7. 43	2,0		175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	23. 7. 43	2,5		
	24. 7. 43		38	
	27. 7. 43	3,0		
	28. 7. 43		58	
	30. 7. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	6. 8. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	11. 8. 43			175 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	12. 8. 43	2,5		
	13. 8. 43		26	
	16. 8. 43	3,5		
	17. 8. 43		38	
	19. 8. 43			200 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	20. 8. 43	3,0		
	21. 8. 43		34	
	24. 8. 43	5,0		
	25. 8. 43		34	
	27. 8. 43	6,5		250 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	29. 8. 43		44	
	2. 9. 43	3,5		
	3. 9. 43		34	
	6. 9. 43			250 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	7. 9. 43	4,5		
	8. 9. 43		22	
	11. 9. 43	5,0		

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Ratte	Datum	Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen im Harn je 24 Stunden mg	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
	12. 9. 43		33	
	15. 9. 43	3,5		250 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	17. 9. 43		25	
	20. 9. 43	3,5		
	21. 9. 43		26	
	23. 9. 43			250 mg/kg Trinitrotoluol intraperitoneal
	24. 9. 43			Tod

p-Oxyphenylbrenztraubensäure stieg ebenfalls an und erreichte erstmalig nach 4, endgültig nach 10 Wochen Werte, die einwandfrei über der oberen Grenze der Norm lagen und bei einzelnen Belastungen 70—80 mg betrugen. Nach 14 Wochen begann die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure wieder abzusinken auf einen Wert innerhalb der Norm. Der Erhöhung der anfänglichen Dosis von 150 mg/kg Trinitrotoluol auf 200 mg/kg folgte ein erneuter Anstieg der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Als sich nach 26 Wochen die Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure wieder der oberen Grenze der Norm näherte, wurde die Trinitrotoluol-Dosis auf 250 mg/kg erhöht. Das Tier starb nach der ersten Injektion dieser Dosis. Das vierte Tier (Ratte G. S. 20) wurde zunächst mit Dosen von 175 mg/kg Trinitrotoluol, dann 200 und schließlich 250 mg/kg behandelt (Tabelle1). Nur bei einer Belastung 3 Wochen nach Beginn der Vergiftung wurde eine Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure, die die obere Grenze der Norm erreichte, beobachtet. Im weiteren Verlauf des Versuchs nahm die Ausscheidung mit stärkeren Schwankungen ab und näherte sich kurz vor dem Tode des Tieres der unteren Grenze der Norm.

Die Ausscheidung der normalen MILLON-Stoffe des Harnes wurde im Verlaufe der Vergiftungen nicht wesentlich verändert.

Oben wurde bereits auf die Rotfärbung des Harnes der Ratten nach der Injektion von Trinitrotoluol hingewiesen. Nach den ersten Injektionen war nur der in den ersten 24 Stunden danach ausgeschiedene Urin merklich rot gefärbt. Im weiteren Laufe der Vergiftungen wurde auch der am zweiten und dritten Tage danach ausgeschiedene Harn rot gefärbt.

4. Chronische Vergiftung von Ratten mit Trinitrotoluol.

Ratten erhielten zunächst täglich 10 mg/kg Trinitrotoluol subkutan, nachdem in einem Vorversuch eine Dosis 20 mg/kg nur 1 Woche lang

vertragen wurde. Nach einigen Wochen wurde die Dosis auf 15 mg/kg erhöht, in einem Falle sogar auf 20 mg/kg. Im Laufe der Vergiftung traten erregende Wirkungen auf das Zentralnervensystem hervor. Diese begannen mit einer Erhöhung der Erregbarkeit für äußere Reize und steigerten sich später zu Krampfanfällen. Dann wurde die Verabreichung von Trinitrotoluol unterbrochen und erst später wieder fortgesetzt, wenn die starke Übererregbarkeit geschwunden war. Belastungen mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurden in mehrwöchigen Abständen durchgeführt.

Drei Tiere ertrugen die Vergiftung 14 bzw. 21 und 23 Wochen lang, ein viertes wurde nach 14 Wochen getötet. Während der Allgemeinzustand der Tiere in den ersten Wochen, abgesehen von einer leichten Übererregbarkeit, gut war, wurde er später schlechter. Die Tiere nahmen an Gewicht ab, das Fell wurde rauh und ungepflegt.

Bei keinem der Tiere wurde im Verlaufe der Vergiftung, auch nicht kurz vor dem Tode, eine Vermehrung der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure über die Norm beobachtet. Dagegen war bei den 3 Tieren, die durch die Vergiftungen starben, eine Abnahme der Ausscheidung nachweisbar. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure durch die Ratte G. S. 19 war auf niedrige, aber noch nicht unternormale Werte abgesunken, als der Versuch wegen Bombenschadens abgebrochen werden mußte. Die Ausscheidung eines zweiten Tieres schwankte 15 Wochen lang in den normalen Grenzen und sank nach Erhöhung der Trinitrotoluol-Dosis auf 20 mg/kg ab auf 15 mg. Das dritte Tier, Ratte G. S. 22, verminderte seine Ausscheidung kontinuierlich von 35 auf 15 mg, dann mußte die Vergiftung wegen schwerer Fliegerangriffe und Bombenschadens im Institut eingestellt werden. Vier Wochen nach Beendigung der Injektion von Trinitrotoluol war die Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure wieder von normaler Größe.

5. Chronische Vergiftung von Hunden mit Trinitrotoluol.

Chronische Vergiftungen mit Trinitrotoluol wurden ferner an 3 Hunden durchgeführt. Die Dauer der einzelnen Versuche betrug $7^1/_2$, 8 und 12 Wochen. Die Vergiftung wurde mit der täglichen subkutanen Injektion von 3 mg/kg Trinitrotoluol begonnen. Nach einigen Wochen wurde die Dosis auf 4—6 mg/kg erhöht. Die ersten Störungen, die bei den Hunden zu beobachten waren, betrafen das Nervensystem. Der Gang der Tiere wurde spastisch-taumelig. Bald darauf konnten die Tiere nicht mehr stehen, lagen auf der Seite und hatten in unregelmäßigen Abständen Krämpfe. Der Hämiglobingehalt des Blutes der Tiere änderte sich nur wenig. Auch das Gewicht der Tiere blieb bis zu den letzten Tagen, wo sie in Seitenlage nicht mehr fraßen, gleich.

Tabelle 2. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und von p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Ratten, die chronisch mit Trinitrotoluol vergiftet wurden.*

Ratte	Datum	Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen im Harn je 24 Stunden mg	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
G.S. 18	20. 5. 43	3,5		
210 g	21. 5. 43		35	
	25. 5. 43	2,5		
	26. 5. 43		42	
	31. 5. 43	3,5		
	1. 6. 43		38	
	4. 6. 43			10 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	15. 6. 43	3,0		
	16. 6. 43		36	
	8. 7. 43	3,0		
	9. 7. 43		44	
	26. 7. 43	2,5		
	27. 7. 43		34	
	16. 8. 43	2,5		
	17. 8. 43		37	
	20. 8. 43			15 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	15. 9. 43	2,5		
	16. 9. 43		43	
	15. 10. 43	3,5		
	16. 10. 43		21	
	5. 11. 43	2,5		
	6. 11. 43		17	
	10. 11. 43			20 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	16. 11. 43	3,0		
	17. 11. 43		15	
	19. 11. 43			Tod
G.S. 19	8. 6. 43	3,0		
230 g	9. 6. 43		35	
	30. 6. 43	3,5		
	1. 7. 43		46	
	6. 7. 43	4,5		
	7. 7. 43		42	
	10. 7. 43			10 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	26. 7. 43	3,0		
	27. 7. 43		38	
	19. 8. 43	3,5		
	20. 8. 43		27	
	15. 9. 43	3,0		
	16. 9. 43		23	
	5. 11. 43	3,0		
	6. 11. 43		25	
	10. 11. 43			15 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	22. 11. 43			Versuch wegen Bombenschadens abgebrochen

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Ratte	Datum	Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen im Harn je 24 Stunden mg	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 150 mg mg	Bemerkungen
G.S. 22	1. 9. 43	2,0		
130 g	2. 9. 43		32	
	6. 9. 43	2,0		
	7. 9. 43		35	
	14. 9. 43	3,5		
	15. 9. 43		34	
	16. 9. 43			10 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	5. 11. 43	2,0		
	6. 11. 43		19	
	10. 11. 43			15 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
	19. 11. 43	1,5		
	20. 11. 43		15	
	22. 11. 43			Versuch wegen Bombenschadens unterbrochen
	20. 12. 43	2,5		
	21. 12. 43		32	

Tabelle 3. *Ausscheidung von normalen* MILLON-*Stoffen und p-Oxyphenylbrenztraubensäure durch den Hund G. S. 7, 16,0 kg während chronischer Vergiftung mit Trinitrotoluol.*

Datum	Ausscheidung von normalen MILLON-Stoffen im Harn je 24 Stunden mg	Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach Eingabe von 2,0 g mg	Bemerkungen
26. 9. 42	120		
27. 9. 42		450	
1. 10. 42	160		
2. 10. 42		550	
6. 10. 42	130		
7. 10. 42		520	
8. 10. 42			3,0 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
23. 10. 42	150		
24. 10. 42		150	
1. 11. 42	200		
2. 11. 42		180	
13. 11. 42	210		
14. 11. 42		200	
17. 11. 42			6,0 mg/kg Trinitrotoluol subkutan täglich
28. 11. 42	230		
29. 11. 42		160	
30. 11. 42			Injektion von Trinitrotoluol unterbrochen
6. 12. 42			Tod

Bei den Hunden wurde ebenfalls nie eine Erhöhung der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Laufe der Vergiftung beobachtet. Bei 2 Tieren schwankte sie innerhalb der Grenzen der Norm, bei dem dritten bewegte sie sich von einem verhältnismäßig hohen Ausgangswert an die untere Grenze der Norm (Tabelle 3).

6. Histologische Untersuchungen.

Um das Ergebnis der Leberfunktionsprüfungen beurteilen zu können, wurden die Lebern der vergifteten Tiere histologisch untersucht. Mit Ausnahme der Lebern einiger Tiere, die kurz nach Beginn der Versuchsreihen starben, wiesen alle Lebern starke morphologische Veränderungen auf. Diese waren bei Ratten und Hunden nicht wesentlich verschieden und wiesen auch keine Beziehung zur Art der Vergiftung (wiederholte akute oder chronische Vergiftung) auf. Im einzelnen wurde beobachtet: Trübe Schwellung, Umbau der Leberstruktur bis zur völligen Verwischung neben atrophischen Bezirken mit sehr geringen Regeneraten, schwärzliche Pigmentierung der Leberzellen und Sternzellen, feintröpfige Verfettung verschiedenen Grades, die bei der Ratte diffus, beim Hunde überwiegend zentral gelegen war, Hämosiderose.

Zusammenfassung.

Bei Ratten wurden wiederholte akute und chronische Vergiftungen und bei Hunden chronische Vergiftungen mit Trinitrotoluol durchgeführt und die Leberfunktion durch Bestimmung des Abbaus von p-Oxyphenylbrenztraubensäure zu prüfen versucht. Obgleich alle Tiere, die infolge der Vergiftung starben, histologisch nachweisbare Schädigungen der Leber aufwiesen, konnte nur bei einigen Ratten, die wiederholt mit großen Dosen Trinitrotoluol vergiftet worden waren, die bei Leberschädigungen erwartete Zunahme der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure beobachtet werden. Während der chronischen Vergiftung von Ratten mit kleinen Dosen Trinitrotoluol nahm die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure in keinem Falle zu, bei mehreren Tieren dagegen ab. Es war also auch bei den — soweit die histologische Untersuchung einen diesbezüglichen Schluß erlaubt — stärkeren Schädigungen der Leber durch Trinitrotoluol ebenso wie bei den früheren Untersuchungen mit m-Dinitrobenzol eine quantitative Bestimmung der Störung der Leberfunktion bei Ratte und Hund nicht möglich. Daß die Änderungen der Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure während der Vergiftung durch Änderungen der Leberfunktion bedingt werden, ist sehr wahrscheinlich und bietet einen weiteren Hinweis auf die Wirkung des Trinitrotoluols auf die Leber.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Zur Pharmakologie des Tetranitromethans.

Von

MANFRED KIESE.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Dezember 1946.)

Tetranitromethan hat starke lokale Reizwirkungen, die beim Umgang mit der öligen Flüssigkeit an den Schleimhäuten der Nase und besonders des Auges schnell bemerkt werden. Seine Reaktionsbereitschaft zeigt es durch die leichte Entzündbarkeit und besonders hohe Brisanz eines geeigneten Gemisches mit organischer Substanz. Durch gewerbetoxikologische Beobachtungen und Tierversuche (FLURY[1]) ist bekannt, daß die Einatmung von Tetranitromethandämpfen ein tödliches Lungenödem bewirken kann und daß dabei als resorptive Wirkung Hämiglobinbildung eintritt. KOELSCH[2] nahm ferner auf Grund einiger Tierversuche eine besondere schädigende Wirkung auf die Leber an. Wir haben die resorptiven Wirkungen des Tetranitromethans nach Injektion bei Tieren näher untersucht.

Methoden.

Die Untersuchungen wurden an Hunden, Katzen und Ratten durchgeführt. Hunden wurde reines Tetranitromethan in eine Beinvene injiziert. Die Einspritzung wurde so langsam durchgeführt, daß die vorgesehene Dosis im Laufe von 15 Min. ins Blut gelangte. Da bei den geringsten Unregelmäßigkeiten in der Lage der Injektionskanüle Schädigungen der Gefäßwand und gar durch Injektion ins Gewebe ausgedehnte Nekrosen eintraten, wurde bei unruhigen Hunden die Injektion in Evipannarkose (30 mg/kg Evipan-Natrium intravenös) durchgeführt. Den Katzen wurde unverdünntes Tetranitromethan intramuskulär injiziert, den Ratten immer frisch bereitete Lösungen von 5% Tetranitromethan in Mohnöl subkutan. Im Blute wurde der Gehalt an Blutfarbstoff, Hämiglobin, Verdoglobin, roten Zellen sowie pathologischen Bildungen an den roten Zellen bestimmt. Nach dem Tode der Tiere wurden histologische Untersuchungen der Organe durchgeführt.

---

[1] FLURY, F. u. F. ZERNIK: Schädliche Gase, S. 417. Berlin 1931. — [2] KOELSCH: Zbl. Gewerbehyg. 5, 185 (1917).

Versuche.

A. Versuche mit Hunden.

1. Allgemeines zum Vergiftungsablauf.

Die Wirkung größerer Dosen Tetranitromethan (30 mg/kg) verlief bei Hunden sehr gleichmäßig. Noch während der intravenösen Injektion trat eine starke Beschleunigung der Atmung ein. Tiere, die nicht narkotisiert waren, wurden wiederholt sehr unruhig. Wurde die Injektion zu schnell durchgeführt, so starben die Tiere noch während oder kurz nach der Injektion. Todesursache war offenbar Lähmung der Atmung. Das Herz schlug noch nach Atemstillstand weiter. Bei langsamer Injektion trat noch während der Injektion von oder kurz danach stark röchelnde Atmung auf und im Maule erschien blutigseröse Flüssigkeit. Überlebte das Tier die ersten Stunden nach der Injektion, so überstand es im allgemeinen die Vergiftung. Der Allgemeinzustand der Tiere war nach der Injektion immer schlecht. Mit stark beschleunigter Atmung blieben sie in Seitenlage. Einige Tiere kollabierten kurz, erbrachen und ließen Urin. Meist trat vermehrter Speichelfluß auf. Noch im Laufe des Tages wurde der Allgemeinzustand meist wieder besser, die Tiere begannen wieder umherzulaufen, wenn auch nur sehr unsicher. Manchmal erbrachen die Tiere noch nach einem halben Tage. 1—3 Tage nach der Injektion fingen die Hunde wieder an zu fressen. Die Beschleunigung der Atmung, die nach körperlichen Anstrengungen außerordentlich stark wurde, bestand noch Tage und Wochen nach der Injektion von Tetranitromethan.

War die Injektion nicht ganz gelungen und durch eine plötzliche Unruhe des Tieres eine kleine Menge Tetranitromethan ins Gewebe injiziert worden, so trat am Orte der Injektion sehr schnell eine starke ödematöse Schwellung auf, die schließlich das ganze Bein betreffen konnte. Nach wenigen Tagen bildete sich nach Abstoßung nekrotischen Gewebes wechselnder Größe ein Geschwür. Die Heilung des Geschwürs hing von seiner Größe ab. Nach schneller Reinigung trat lebhafte Granulation ein. Eine Schädigung des noch erhaltenen Gewebes, die die Heilung verzögert hätte, schien nicht vorhanden zu sein. Sehr häufig thrombosierte die Vene, in die das Tetranitromethan injiziert war, auch wenn das Tetranitromethan vollständig in die Vene gelangte.

Nach etwa 10 Tagen, in wenigen Fällen früher, wurde die Vergiftung wiederholt und nahm, sofern der Hund überlebte, einen ganz ähnlichen Verlauf wie die erste Vergiftung. Bei einem Tier wurde sie 8 mal wiederholt. Es starb kurz nach der letzten Injektion, die in eine Halsvene erfolgen mußte, da die Beinvenen thrombosiert waren.

Durch wiederholte Vergiftungen verschlechterte sich der Allgemeinzustand der Tiere auch für längere Zeit nach den Vergiftungen. Sie verloren an Gewicht, auch vorher sehr lebhafte Tiere wurden sehr ruhig, angestrengte Arbeit wie schnelles Laufen oder schnelles Treppensteigen verweigerten sie.

2. Veränderungen des Blutes.

Von den Wirkungen des Tetranitromethans ließen sich die Veränderungen des Blutes in ihrem Ablauf verfolgen. Sie betreffen sowohl den Blutfarbstoff wie die roten Zellen. Wurde zu 50 ml Blut in vitro 1 Tropfen Tetranitromethan gesetzt und das Gemisch bei 37° langsam geschüttelt, so waren in 30 Min. über 90% des Hämoglobins zu Hämiglobin oxydiert worden. Dementsprechend erfolgte auch nach intravenöser Injektion eine schnelle Hämiglobinbildung, die in 30 Min. die höchste Hämiglobinkonzentration im Blute erreichte. Nach Dosen von 25 mg/kg Tetranitromethan betrug die höchste Hämiglobinkonzentration im Mittel 3,5 $\pm$ 0,5 g/100 ml. Das waren im Mittel 24,0 $\pm$ 3,5% des Gesamtblutfarbstoffs. Die Hämiglobinbildung dauerte nur kurze Zeit an. Nach 8,2 $\pm$ 0,8 Stunden war die Hämiglobinkonzentration wieder unter 0,5 g/100 ml zurückgekehrt. Die in den einzelnen Versuchen erreichten Hämiglobinkonzentrationen sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Dort sind auch einige Versuche angeführt, bei denen höhere Dosen von Tetranitromethan, nämlich 30 und 40 mg/kg, angewandt wurden. Die mit diesen Dosen erreichten Hämiglobinkonzentrationen waren im Mittel höher.

Verdoglobinbildung in einem einwandfrei bestimmbaren Ausmaße fand nicht statt.

Nicht ganz so schnell wie die Hämiglobinbildung liefen einige andere Veränderungen ab, die in Abb. 1 ebenfalls wiedergegeben sind. In fast allen Versuchen nahm in den ersten Stunden nach der Injektion des Tetranitromethans die Konzentration an Gesamtblutfarbstoff zu. In den Versuchen, in denen 25 mg/kg Tetranitromethan injiziert wurde, betrug diese Zunahme im Mittel 2,0 g/100 ml, was einer Erhöhung um 14% der ursprünglichen Blutfarbstoffkonzentration entsprach. Nach mehreren Stunden kehrte die Blutfarbstoffkonzentration wieder auf den vorherigen Wert zurück und sank im Laufe der nächsten Tage in den meisten Versuchen unter den Ausgangswert. Diese Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration unter den Ausgangswert betrug im Mittel 2,4 g/100 ml, d. h. 16,6% der ursprünglichen Konzentration. Der tiefste Wert der Blutfarbstoffkonzentration war im Mittel nach 2,7 Tagen erreicht. Im allgemeinen war die Anämie bei der neuen Injektion von Tetranitromethan, die in 3—14 Tagen auf die vorhergehende folgte, noch nicht wieder vollständig repariert, so daß bei

Tabelle I. *Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins,* Heinz-*Körper und „großen Zellen" nach intravenöser Injektion von Tetranitromethan bei Hunden.*

Hund	Nr. der Vergiftung	Gewicht kg	Dosis mg/kg	Blutfarbstoffkonzentration g/100 ml Blut: vor Injektion	Zunahme auf	nach Stunden	Abnahme auf	nach Tagen	Heinz-Körper in % der roten Zellen	„Große Zellen" in % der roten Zellen	Hämiglobin: Höchste Konzentration g/100 ml	Rückkehr zur Norm nach Stunden	Anteil des Hämiglobins am Gesamt-Blutfarbstoff %
Thomas	I	27	25	15,8	17,6	2	12,5	7			3,0	10	17
nach 54 Tagen	II		25	14,9	17,5	6	13,9	3	5	1	2,2	6	15
nach 12 Tagen	III	25	25	15,0	16,1	2	13,1	1	8	2	3,5	10	27
nach 10 Tagen	IV	24,5	25	12,9	15,9	2	9,0	1	6	3	4,5	10	33
nach 7 Tagen	V	24	25	11,2	11,9	1	—	—	12	5	1,2	4	10
nach 4 Tagen	VI		25	11,2	13,1	$2^1/_2$	9,3	2	12	5	2,3	6	21
nach 10 Tagen	VII		40	12,8	unterhalb eines Thrombus injiziert, Nekrose, sehr geringe Allgemeinwirkung								
nach 3 Tagen	VIII		40	11,7	Tod $^1/_2$ Stunde nach Injektion						6,6		56
Treff	I	24	25	17,1	20,5	6	11,5	2	4	2	3,3	10	20
nach 10 Tagen	II	24	25	14,4	17,6	3	12,8	3	3	2	3,8	8	25
nach 6 Tagen	III		25	14,4	—	—	12,3	2	6	4	0,9	4	7
nach 19 Tagen	IV	22,5	25	14,1	15,9	2	Tod nach 4 Stunden		5	2	6,0	—	38
Dorchen	I	22	25	15,8	18	6	14,2	2	19	2	3,5	10	21
nach 13 Tagen	II		25	14,5	17,5	7	11,9	4	8	2	3,3	12	23
nach 13 Tagen	III		25	12,7	13,7	2	Tod nach 2 Stunden		6	3	7,8	—	57
Senta	I	20	30	14,8	17,8	3	—	—	7	3	5,4	9	31
nach 14 Tagen	II	20	30	15,2	17,6	8	—	—	5	2	5,3	10	34
nach 6 Tagen	III	19	30	16,1	Tod 20 Min. nach Beendigung der Injektion						6,4	—	40

3 Tieren eine fortschreitende Verminderung der Blutfarbstoffkonzentration eintrat, bei einem Tier allerdings eine Zunahme. Retikulozyten wurden in keinem Stadium der Vergiftung in höherer Konzentration beobachtet. Ihre Menge stieg nie über 2% der roten Zellen und bewegte sich meist zwischen 0,5 und 2%.

Kurze Zeit nach der Injektion des Tetranitromethans waren bereits Veränderungen an den roten Zellen zu beobachten. Einerseits traten HEINZ-Körper auf, die sich als kleine einzelne, mitunter verzweigte oder auch seltener als multiple Gebilde darstellten. Die Zahl der befallenen Erythrozyten blieb immer unter 20% der roten Zellen und betrug im Mittel 7,5%. Daneben wurden regelmäßig in geringerer Zahl rote Zellen mit morphologisch abweichenden Veränderungen beobachtet, die wir im Laboratorium als „große Zellen" bezeichneten. Sie erschienen größer als die übrigen roten Zellen und enthielten massive verzweigte mit Nilblau oder Kresylblau anfärbbare Gebilde, die sich durch Größe und Form sowohl von den HEINZ-Körpern wie vom „Retikulum" der Retikulozyten unterschieden. Sie waren den Veränderungen ähnlich, die unter der Wirkung von p-Diaminobenzol eintreten. Herr Dr. JUNG hatte von diesen Zellen einige — leider verlorene — elektronen-optische Aufnahmen gemacht, die ein ganz ähnliches Bild dieser Gebilde gaben, wie die gefärbten Präparate. Die Zahl dieser Zellen war geringer als die der roten Zellen mit HEINZ-Körpern und betrug im Mittel $2^1/_2$% der roten Zellen. Die Entwicklung dieser Gebilde verlief schnell. 2—3 Stunden nach der Injektion des Tetranitromethans hatten sie, wie auch im Versuch der Abb. 1, ihre höchste Zahl und auch bereits ihre volle Größe erreicht. Die HEINZ-Körper erreichten oft auch schon nach 3—4 Stunden, im Gegensatz zum Versuch der Abb. 1 ihre größte Zahl. HEINZ-Körper und „große Zellen" verschwanden im Laufe von 4—10 Tagen wieder aus dem Blute, diese schneller als die HEINZ-Körper.

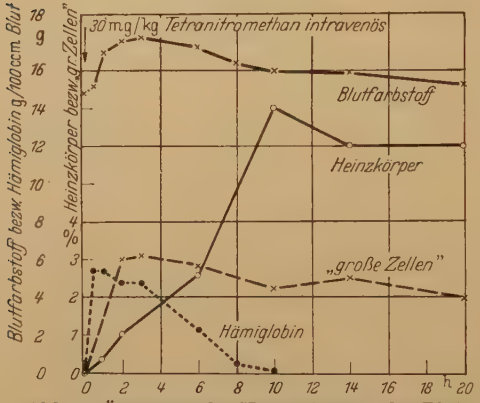


Abb. 1. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins, HEINZ-Körper und „großen Zellen" im Blute des Hundes nach intravenöser Injektion von 30 mg/kg Tetranitromethan. — Hund 20 kg. Erste Injektion von Tetranitromethan.

Der Bilirubingehalt des Blutserums betrug nach der Injektion von Tetranitromethan um 1 mg/100 ml und erreichte nur in 2 Versuchen 1,5 mg/100 ml.

3. Veränderungen anderer Organe.

Wirkungen des Tetranitromethans auf andere Organe konnten, so lange die Tiere lebten, nur in beschränktem Maße erschlossen werden. Unverkennbar war die Schädigung der Lunge, da die Zeichen des Lungenödems ganz sinnfällig waren. Im Harn der Tiere wurde mehrmals an dem ersten Tage nach der Injektion von Tetranitromethan ein vermehrter Proteingehalt gefunden. Der Gehalt des Harns an Urobilinogen, Urobilin und Bilirubin war nie vermehrt.

Die Sektion der Tiere, die nach der Injektion von Tetranitromethan starben, bot bei allen 4 Tieren sehr ähnliche Befunde. Nach der Eröffnung des Brustkorbs kollabierten die Lungen nur unvollständig. Ihre Oberfläche war bunt; neben hellen Bezirken mit lufthaltigen Bläschen befanden sich blutig gefärbte Flecken, ferner kleine Bezirke von grauer Farbe. Bei einem Tier (Senta) war die linke Lunge fest mit der Brustwand verklebt. Nach ihrer Ablösung wurde ein großer nach allen Seiten gut abgegrenzter Abszeß in der Lunge zugänglich. Die Lungen waren schwer und von gummiartiger Beschaffenheit. Die Schnittfläche war bunt wie die Oberfläche. Blutig-seröse Flüssigkeit floß von den Schnittflächen in reichlicher Menge ab. Der Flüssigkeitsgehalt der Lungen der Tiere, die eine halbe Stunde nach der Injektion des Tetranitromethans verstorben waren, war geringer als der der Lungen später gestorbener Tiere.

Die Herzen waren schlaff und weit. Ein Tier (Thomas) hatte im Herzbeutel eine größere Menge seröser Flüssigkeit. Die Lebern ließen zum Teil deutliche Felderung erkennen. Die Schnittfläche war trüb. Die Milz war stark kontrahiert und fest. Die Nieren zeigten auf dem Schnitt starke radiäre Streifung und leichte Trübung des Parenchyms. Der Darm war entleert und kontrahiert.

War das Tetranitromethan zu schnell injiziert worden, so daß wenige Minuten nach Beginn der Injektion bereits der Tod eintrat, so war außer einer Braunfärbung des Blutes makroskopisch keine Veränderung der Organe festzustellen.

Veränderungen der Gewebe waren vornehmlich in den Lungen und in den Lebern vorhanden. Neben weitgehend intakten Bezirken waren in den Lungen frische Schädigungen verschiedenen Grades und Umfangs und ältere, die von früheren Vergiftungen stammten. Diese waren je nach ihrem Alter Nekrosen in verschiedenen Stadien der Organisation, teils mit eben beginnender Durchdringung mit Bindegewebszellen und -fasern, teils noch zellreich, andere schon zellarme Narben. Die frischen Veränderungen bestanden teils nur in stärkster Erweiterung der Kapillaren mit Verdickung der Kapillarwände, ferner im Austritt seröser Flüssigkeit in die Alveolen. In einem Teil der Alveolen war

Tabelle 2. *Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins,* HEINZ- *bei*

Katze	Nr. der Vergiftung	Gewicht kg	Dosis mg/kg	Blutfarbstoff g/100 ml: vor Injektion	Anstieg auf	nach Stunden	Abnahme auf	nach Tagen
Brutus	I	3,4	65 i.m.	12,8	16,4	9		
nach 6 Tagen	II		65 i.m.	10,0	14,3	3	6,8	3
nach 11 Tagen	III	3,3	65 i.m.	9,9	15,5	9	9,9	3
nach 10 Tagen	IV		65 i.m.	10,0	14,4	7	8,4	6
nach 6 Tagen	V	3,0	65 i.m.	8,4	12,0	3		
nach 13 Tagen	IV	2,7	100 i.m.	10,5	15,0	9		
nach 6 Tagen	VII	2,5	100 i.m.	11,0	12,0	4	10,0	3
nach 9 Tagen	VIII	2,6	100 i.m.	10,2	12,8	8		
nach 11 Tagen	IX	2,4	100 i.m.	11,5	11,8	4	9,0	1
Else		2,8	300 s.k.	14,9				
Mariechen		2,3	300 s.k.	12,9				
Gerda		2,2	165 i.m.	8,1				
Senta		1,9	165 i.m.	9,0	10,5	1		
Waldteufel		2,3	83 i.m.	13,5	15,5	12	8,7	6
Clara		1,8	83 i.m.	13,5				
Agathe		2,3	83 i.m.	13,4			8,5	3
Nora		3,2	83 i.m.	10,5				
Prinz		2,3	83 i.m.	8,1				
Jumbo		2,6	83 i.m.	8,9				
Brigitte		1,5	83 i.m.	11,7				

die Wand zerstört und Blut aus den Gefäßen in den Alveolarraum übergetreten; schließlich waren ganze Bezirke in beginnender Nekrose.

In den Lebern waren die Zellbalken weit voneinander gedrängt, die Leberzellen zum Teil dissoziiert und alle stärkst getrübt, in wenigen umschriebenen Bezirken in beginnender Nekrose. Die Kapillaren waren erweitert, ihre Wandung verdickt und stellenweise zerstört. Die perikapillären Räume waren fast überall sehr stark erweitert. Vermehrung von Bindegewebe wurde nicht beobachtet. Der Eisengehalt der Sternzellen war vermehrt.

Bei einem Hunde war am fünften Tage nach der zweiten Vergiftung ein Stückchen Leber entfernt worden, um zu untersuchen, wie sich die Veränderungen, die in den anderen Fällen immer kurze Zeit nach einer tödlichen Dosis Tetranitromethan beobachtet wurden, nach mehreren Tagen verhalten. Die Leber wies noch sehr deutlich die eben beschriebenen Veränderungen auf. Sie waren so ausgeprägt wie in einigen anderen Fällen kurz nach einer tödlichen Vergiftung.

Die Parenchymzellen der Nieren zweier Tiere waren getrübt.

Körper und „großen Zellen" nach intramuskulärer Injektion von Tetranitromethan Katzen.

Heinz-Körper in % der roten Zellen		„Große Zellen" in % der roten Zellen	Hämiglobin				Bemerkungen
Vorhanden	Zunahme		Höchste Konzentration in g/100 ml	nach 24 Stunden g/100 ml	Rückkehr zur Norm in Stunden	Anteil am Gesamtblutfarbstoff %	
16	6	4	6,0	1,4	36	38	
31	14	6	6,6	2,5	48	48	nach 7 Tagen ungefähr 4% Heinz-Körper keine ‚großen Zellen' mehr
25	7	6	4,8	1,3	40	31	
30	18	3	2,8	1,9	48	19	
25	11	2	1,7	0,2	24	14	
22	10	5	6,5	2,2	48	43	
32	14	6	3,7	0,7	36	33	
26	8	5	5,4	2,7	48	42	
25	10	2	2,8			28	
9	3	3	11,1			85	Tod nach 7 Stunden
22	20	4	4,8			45	Tod nach 20 Stunden
			5,0			77	Tod nach 2 Stunden
			5,3			50	Tod nach 1 Stunde
19	12	7	9,3	1,1	48	64	Tod nach 20 Tagen
17	2	7	7,4			63	Tod nach 8 Stunden
16	12	7	4,8	2,5	48	42	Tod nach 6 Tagen
11	3	9	6,0			67	Tod nach 10 Stunden
10	3	9	3,3			41	Tod nach 20 Stunden
12	7	8	4,4			57	Tod nach 16 Stunden
14	5	6	4,4			43	Tod nach 24 Stunden

B. Versuche mit Katzen.

Während die subkutane Injektion vom unverdünnten Tetranitromethan bei Katzen auch regelmäßig zu Nekrose und Ulzeration führte, erfolgte nach Injektion in die Beinmuskulatur eine Ulzeration nur ausnahmsweise. Immer trat bald nach der Injektion eine Schwellung des Gebietes der Applikation auf, und die Funktion des Beines wurde beeinträchtigt.

Der Allgemeinzustand der Katzen verschlechterte sich 1—2 Stunden nach der Injektion von 65—300 mg/kg Tetranitromethan. Die Tiere legten sich und bewegten sich nur, wenn sie gelockt wurden. Ihr Gang war dann taumelig. Die Bewegungen waren langsam, manchmal fast wachsartig. Die Störung war ganz offensichtlich nicht nur durch die Beeinträchtigung des Beins bedingt, in das das Tetranitromethan injiziert worden war. Nach den großen Dosen waren die Tiere bald gar nicht mehr zum Laufen fähig und blieben dann in Seitenlage, bis im Laufe eines Tages der Tod eintrat. Fast in allen Versuchen trat 1 bis 2 Stunden nach der Injektion ein starker Speichelfluß auf, der bei

einigen Tieren mehrere Stunden anhielt. Die Atmung der Tiere wurde frequenter und angestrengter etwa in dem Maße wie die Zyanose deutlicher sichtbar wurde.

Die Dosis von 65 mg/kg konnte einer Katze in Abständen von 6—13 Tagen 5mal injiziert werden und danach die Dosis von 100 mg/kg noch 4mal, während Dosen von 83 mg/kg und darüber andere Tiere ausnahmslos nach einmaliger Injektion töteten, meist schon am ersten Tage.

Ebenso wie bei den Hunden nach intravenöser Injektion traten auch bei den Katzen nach intramuskulärer Injektion Veränderungen der

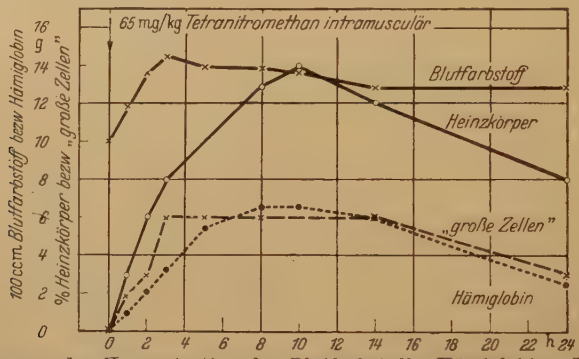


Abb. 2. Änderung der Konzentration des Blutfarbstoffs, Hämiglobins, HEINZ-Körper und „großen Zellen" im Blute der Katze nach intramuskulärer Injektion von 65 mg/kg Tetranitromethan. Die HEINZ-Körper-Konzentration drückt nur die Zunahme nach der Injektion aus. Katze 3,4 kg. Zweite Injektion von Tetranitromethan.

Konzentration und des Zustandes des Blutfarbstoffs und der roten Zellen ein. Diese sind aus den Daten der Tabelle 2 zu entnehmen. In Abb. 2 ist außerdem der Ablauf der Wirkungen in den ersten 24 Stunden nach der Injektion einer Dosis von 65 mg/kg Tetranitromethan genauer dargestellt.

Bei dem Tier, das 9mal vergiftet wurde, trat regelmäßig zunächst eine Zunahme der Blutfarbstoffkonzentration ein, die im Mittel 3,5 g je 100 ml betrug. Das bedeutete eine mittlere Zunahme um 35% der ursprünglichen Blutfarbstoffkonzentration. Sie erreichte durchschnittlich in 6 Stunden ihren Höhepunkt. Die gleiche Reaktion wurde nur bei 2 weiteren Tieren beobachtet. Später sank in den meisten Versuchen und ebenso bei den beiden Tieren, die eine Dosis, von 83 mg/kg mehrere Tage überlebten, die Blutfarbstoffkonzentration unter den Ausgangswert.

Langsamer als nach der intravenösen Injektion des Tetranitromethans bei Hunden stieg die Hämiglobinkonzentration im Blute der Katzen an. Sie erreichte ihren Höchstwert im Mittel erst nach 8 Stunden. Nach Dosen von 83 mg/kg betrug die höchste Hämiglobinkonzentration im Mittel verschiedener Tiere 7,1 g/100 ml, das waren im

Mittel 53% des Gesamtblutfarbstoffs. Bei dem Tier, das 9mal mit Tetranitromethan behandelt wurde, schien die hämiglobinbildende Wirkung mit der Wiederholung schwächer zu werden. Die Hämiglobinbildung hielt immer längere Zeit an. Mit Ausnahme eines Versuchs war die Hämiglobinkonzentration 24 Stunden nach der Injektion des Tetranitromethans noch erhöht, sofern die Tiere zu dieser Zeit noch lebten. Meist betrug die Konzentration noch um 2 g/100 ml. Erst nach 36—48 Stunden war sie wieder unter 0,5 g/100 ml gesunken.

Erhöhungen der Verdoglobinkonzentration wurden nicht beobachtet.

In ähnlichem Verlauf wie die Zunahme der Hämiglobinkonzentration traten Veränderungen an den roten Zellen auf. Ebenso wie bei den Hunden wurden sowohl Heinz-Körper wie „große Zellen" beobachtet. Katzen haben schon ohne die Einwirkung irgendwelcher Gifte Heinz-Körper manchmal in erheblicher Zahl an ihren roten Zellen. Nach der Einwirkung von Tetranitromethan stieg ihre Zahl immer an, nach Dosen von 83 mg/kg im Mittel um 6% der roten Zellen. Die Zahl der „großen Zellen" erreichte meist schneller ihren Höchstwert als die der Heinz-Körper. „Große Zellen" wurden nach Dosen von 83 mg/kg Tetranitromethan im Mittel zu 8% der roten Zellen gefunden. Vor der Behandlung mit Tetranitromethan wurden „große Zellen" im Blute der Katzen nicht beobachtet.

Die Untersuchung der Organe zeigte bei mehreren Tieren Schädigungen der Lungen und Lebern auf. Die Lungenkapillaren waren geschwollen, in einigen Alveolen geringe Mengen proteinhaltiger Flüssigkeit. Die Lebern wiesen geringe trübe Schwellung auf, die perikapillären Räume waren erweitert.

C. Versuche mit Ratten.

Einer Ratte von 200 g wurde 0,17 g unverdünntes Tetranitromethan subkutan injiziert. Sie lief noch etwa 2 Stunden umher. Die Atmung wurde unregelmäßig und vertieft. Nach 3 Stunden war sie deutlich zyanotisch und lag ruhig in einer Ecke. Nach 4 Stunden durch Herzpunktion entnommenes Blut hatte einen Hämiglobingehalt von 67% des Gesamtblutfarbstoffs. Heinz-Körper waren an 13% der roten Zellen vorhanden und „große Zellen" zu 4% der roten Zellen. Das Tier starb nach 9 Stunden. In der Leber waren die Zellbalken auseinander gedrängt und die perikapillären Räume erweitert. Lunge, Herz, Niere und Milz wiesen keine morphologischen Veränderungen auf.

Einer Gruppe von 20 Ratten wurde zur Prüfung der chronischen Wirkung von Tetranitromethan täglich Tetranitromethan in öligen Lösung subkutan injiziert, zunächst 14 Tage lang eine Dosis vor

100 mg/kg, danach von 300 mg/kg. Die Anwendung des Tetranitromethans in öliger Lösung war zwar erforderlich, da die kleinen den Ratten zu injizierenden Mengen von Tetranitromethan in unverdünnter Substanz nicht abzumessen waren und die subkutane Injektion des unverdünnten Tetranitromethans auch zu starke lokale Schäden gesetzt hätte, doch war die Dosierung nicht ganz einwandfrei, da das Tetranitromethan mit dem Öl reagierte. Nach Zugabe des Tetranitromethans zum Öl färbte sich die Lösung zunächst gelb bis braun, hellte nach kurzem Stehen auf und nahm schließlich eine grünliche Färbung an.

Mehrere Tage nach Beginn der Injektionen wurde das Fell der Tiere struppig und der Gang einiger Tiere etwas hochbeinig. Unter der Haut bildeten sich an den Injektionsstellen feste Infiltrate, so daß schließlich die ganze Rückenhaut eine feste Schwarte war. Die Tiere starben 3—14 Tage, nachdem die tägliche Dosis von 100 auf 300 mg/kg Tetranitromethan erhöht worden war. Mit der Erhöhung der Dosis wurde der Allgemeinzustand schlechter, das Gewicht der Tiere nahm ab. An Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz waren morphologische Veränderungen außer geringer Trübung der Parenchymzellen einiger Lebern nicht sicher festzustellen.

Einigen Tieren war im Laufe der Vergiftung Blut durch Herzpunktion entnommen worden. Der Hämiglobingehalt überstieg nicht 15% des Gesamtblutfarbstoffs. HEINZ-Körper waren an 10—30% der roten Zellen vorhanden, „große Zellen“ zu 5—10% der roten Zellen.

Besprechung.

Als Wirkungen des Tetranitromethans nach perenteraler Injektion wurden gefunden: Schädigung der Kapillaren, der Parenchymzellen der Leber und Niere, der roten Zellen und Bildung von Hämiglobin. Die Wirkungen traten nach intravenöser Injektion schnell ein. Sie scheinen zum Teil, wie die Schädigung der Kapillaren und Parenchymzellen durch die unspezifischen lokalen Wirkungen des Tetranitromethans bedingt zu sein. Der besonders starke Grad der Schädigung der Lunge nach intravenöser Injektion des Tetranitromethans dürfte einerseits durch die schnelle Reaktion des Tetranitromethans und andererseits durch die hohe Konzentration, in der es in die Lunge gelangt, bedingt sein. Die im Vergleich mit den anderen Organen stärkere Schädigung der Leber dürfte von einer größeren Empfindlichkeit dieses Organs bestimmt sein. Als Todesursache bei den akuten Vergiftungen der Hunde ist das Zusammenwirken mehrerer Schäden anzunehmen: Lungenödem, Hämiglobinbildung, Schädigung des Zentralnervensystems. Trotz der morphologisch nachweisbaren Schäden der Leber scheinen die Funktionsstörungen dieses Organs nicht beträchtlich zu sein, jedenfalls keinen entscheidenden Anteil an der tödlichen

Wirkung zu haben. Dagegen dürften Schädigungen des Zentralnervensystems sehr wesentlich sein und bei schneller Injektion des Tetranitromethans allein den Tod der Tiere durch Lähmung der Atmung verursacht haben. Auch bei den chronisch vergifteten Ratten ist die Schädigung des Zentralnervensystems als Todesursache anzunehmen, da Veränderungen anderer Organe nur gering waren.

Gelangte das Tetranitromethan langsamer in den Organismus, wie bei den Katzen und Ratten nach intramuskulärer oder subkutaner Injektion, so waren die morphologisch nachweisbaren Veränderungen in der Leber stärker als in der Lunge. Die Schäden der Leber scheinen sowohl hinsichtlich der Beeinträchtigung der Funktion des Organs wie der Reparationsmöglichkeit sehr gutartig zu sein. Denn auch bei wiederholter Vergiftung wurden keine stärkeren Leberfunktionsstörungen und auch kein tiefer greifender Umbau des Organs beobachtet.

Die starke Beteiligung der Kapillaren an der Schädigung der Organe durch Tetranitromethan wird auch durch die Eindickung des Blutes, die in vielen Versuchen zu beobachten war, deutlich.

Unter den Veränderungen des Blutes ist das Auftreten zweier morphologisch verschiedener Veränderungen in den roten Zellen auffällig. Die massiven Niederschläge in den „großen Zellen" traten schneller auf als die Heinz-Körper, und die „großen Zellen" verschwanden meist schneller aus dem Blut als die Heinz-Körper. Vielleicht handelt es sich bei den „großen Zellen" um eine stärkere Schädigung der roten Zellen als bei der Bildung von Heinz-Körpern.

Die Schädigung der roten Zellen war als die wesentliche Ursache der geringen Anämie zu betrachten, die in den meisten Versuchen auftrat, nachdem die Erhöhung der Blutfarbstoffkonzentration wieder vorüber war. Die Anämie wurde meist schnell wieder beseitigt und zwar ohne stärkere Vermehrung der Retikulozyten.

Eine Erhöhung der Hämiglobinkonzentration war in allen Versuchen vorhanden, in denen der Hämiglobingehalt des Blutes bestimmt worden war. Sie erreichte nie eine derartige Höhe, daß die tödliche Wirkung des Tetranitromethans auf eine durch übermäßige Hämiglobinbildung bedingte Anoxie zurückzuführen wäre. Zwar lief die Hämiglobinbildung durch Tetranitromethan ziemlich schnell ab, aber andere Reaktionen mit anderen Zellen waren offenbar noch schneller.

Das Tetranitromethan hielt sich nach intravenöser Injektion nur wenige Stunden in reaktionsfähiger Form im Organismus, wie aus dem Ablauf der Änderung der Hämiglobinkonzentration beim Hunde zu schließen ist. Wenn andererseits bei den Katzen nach intramuskulärer Injektion die Hämiglobinkonzentration im Blute erst nach 8 Stunden ihren Höchstwert erreichte und die Hämiglobinbildung über 36 bis

48 Stunden anhielt, so ist anzunehmen, daß die Resorption des Tetranitromethans aus dem Gewebe langsam erfolgte. Die Verzögerung dürfte teils durch die geringe Löslichkeit des Tetranitromethans in Wasser, im wesentlichen aber durch die starken lokalen Schädigungen (Nekrose, starkes Ödem) bedingt sein.

Fräulein Ingeborg Klempau und Gesche Siems habe ich für wertvolle Hilfe bei den Versuchen zu danken.

Zusammenfassung.

Tetranitromethan bewirkte nach intravenöser Injektion bei Hunden starke Schädigung der Kapillaren, die sich besonders in der Bildung eines Lungenödems und Ödems der Leber äußerten. Die Wirkung trat sehr schnell ein. Außerdem wurden Schädigungen des Zentralnervensystems, der Parenchymzellen der Leber und — weniger — der Niere beobachtet. An den roten Zellen traten zweierlei morphologisch unterscheidbare Veränderungen auf, nämlich Heinzsche Körper und gröbere ausgedehntere ebenfalls mit Nilblau färbbare Niederschläge. Die Blutfarbstoffkonzentration, die zunächst infolge der Ödembildung anstieg, sank später ein wenig unter den Ausgangswert. Die Hämiglobinkonzentration wurde erhöht. Wie aus dem Verlauf ihrer Änderung zu sehen war, blieb das Tetranitromethan nur kurze Zeit nach der Resorption im Organismus wirksam.

Nach intramuskulärer Injektion bei Katzen wurden gleichartige Wirkungen beobachtet, jedoch kein Lungenödem, das nach intravenöser Injektion den Ablauf der Vergiftung beherrschte.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Pharmakologische Untersuchungen über m-Dinitrobenzol *.

V. Mitteilung.

m-Dinitrobenzol und Alkohol.

Von

Dietrich Gaede † und Manfred Kiese**.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 3. April 1947.)

Das Zusammenwirken zweier Pharmaka bietet in mehrfacher Hinsicht Interesse. Beiden Stoffen nur in geringem Maße zukommende Wirkungen können beim Zusammenwirken unverhältnismäßig stark hervortreten („Potenzierung"). Die genauer bekannten Änderungen der Funktionen des Organismus durch einen Stoff können zur Analyse und Charakterisierung der Wirkung eines anderen beitragen, wie etwa Kokain, Ergotamin und Atropin bei Wirkungen auf das vegetative Nervensystem. Schließlich kann es sich neben dem theoretischen Problem des Zusammenwirkens um mehr praktische Interessen handeln, wie die Beeinflussung einer Wirkung durch den häufig hinzutretenden Einfluß eines Genußmittels wie Alkohol. In der Gewerbetoxikologie ist sehr häufig auf eine gegenseitige Beeinflussung der Wirkung von verschiedenen Giften und der des Alkohols hingewiesen worden, vornehmlich bei Stoffen, die wie der Alkohol selbst auf das Nervensystem und die Leber wirken, z. B. Blei, Arsen, Quecksilber. Besondere Beachtung hat in der Gewerbetoxikologie das Zusammenwirken verschiedener Amino- und Nitrobenzole mit Alkohol gefunden, da bei der chronischen Vergiftung mit diesen Stoffen eine starke Steigerung der Empfindlichkeit für Alkohol beobachtet wird und der Alkohol unter anderem Wirkungen verstärkt, wie die Zyanose, die ihm allein nicht zukommen. Bei Anilin- und Nitrobenzolarbeitern werden immer wieder durch nur geringfügigen Alkoholgenuß nach Beendigung der Arbeit Zustände schwerer zentraler Störungen und starker Zyanose ausgelöst. Experimentelle Untersuchungen zu diesem Problem haben Lehmanns Schüler Chilian[1] und Niggemeier[2] durchgeführt. Sie beobachteten

* IV. Mitt. siehe Kiese, M., u. G. Siems: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 528 (1949).

** Dietrich Gaede ist Anfang April 1945 in Ungarn gefallen. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche, die im Rahmen unserer umfangreichen Untersuchungen über die m-Dinitrobenzolwirkung ausgeführt wurden, hat Gaede zusammen mit Fräulein Ingeborg Klempau durchgeführt. Ich habe die Protokolle ausgewertet (Kiese).

[1] Chilian, K.: Diss. Würzburg 1902. — [2] Niggemeier, H.: Diss. Würzburg 1903.

bei gleichzeitiger Verabreichung von Alkohol eine Verstärkung der Allgemeinwirkungen des Anilins und des m-Dinitrobenzols. Später fand Schwedtke[3], daß bei Katzen die Hämiglobinbildung durch Anilin durch gleichzeitige Alkoholgabe vermehrt wird. Herken[4] konnte diese Beobachtung grundsätzlich bestätigen. Wie es durch die Gegenwart von Alkohol zur Vermehrung der Hämiglobinbildung kommt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Eine Hemmung der Reduktion des Hämiglobins durch den Alkohol tritt offenbar nicht ein (Jung[5]). v. Issekutz[6] beschrieb später auch eine steigernde Wirkung des Alkohols auf die Hämiglobinbildung bei Katzen durch Phenylhydroxylamin, p-Aminophenol und m-Dinitrobenzol, jedoch konnte Herken[4] diesen Einfluß des Alkohols auf die Erhöhung der Hämiglobinkonzentration durch m-Dinitrobenzol nicht bestätigen.

Alkoholintoleranz wird jedoch auch bei m-Dinitrobenzolarbeitern beobachtet, und es wurde darum in mehreren Versuchsreihen geprüft, wie sich Alkohol und m-Dinitrobenzol im Tierversuch in anderen Wirkungen als der Hämiglobinbildung besonders auch bei chronischer Darreichung beeinflussen. Neben dem Äthanol wurden auch n-Propanol, iso-Propanol und n-Butanol in anderen Versuchen geprüft, um zu untersuchen, ob die beobachtete gegenseitige Beeinflussung des m-Dinitrobenzols und Äthanols für dieses spezifisch ist oder eine Wirkung der Alkohole überhaupt. Schließlich wurde auch der Acetaldehyd, der wahrscheinlich beim Abbau des Äthanols auftritt, auf seine Beeinflussung der m-Dinitrobenzolvergiftung geprüft.

Die Versuchsanordnungen werden der Beschreibung der einzelnen Versuchsgruppen vorangestellt. Die Methoden zur Blutuntersuchung sind in der 1. Mitteilung beschrieben[7].

Versuche.

1. Unbeeinflußte Vergiftung von Hunden mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol.

Um Veränderungen des Ablaufs der m-Dinitrobenzolvergiftung sicher beurteilen zu können, waren genaue Daten über die akute Vergiftung mit m-Dinitrobenzol erforderlich. In den früheren Untersuchungen[7] waren mit der Dosis von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol, die sich für die hier beschriebenen Versuche am besten geeignet erwies, nur 10 Versuche durchgeführt worden. Darum wurden noch weitere 22 Versuche mit der gleichen Dosis an Hunden unternommen. Die Tiere erhielten das m-Dinitrobenzol zu 2% in Mohnöl oder Olivenöl gelöst subkutan injiziert. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 1

[3] Schwedtke, G.: Arch. exper. Path. (D.) **188**, 131 (1939). — [4] Herken, H.: Unveröffentlichte Versuche. Berlin 1943. — [5] Jung, F.: Arch. exper. Path. (D.) **192**, 464 (1939). — [6] Issekutz jun., B. v.: Arch. exper. Path. (D.) **193**, 551 (1939). — [7] Kiese, M.: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 361 (1949).

zusammengestellt. Die von m-Dinitrobenzol bewirkten Veränderungen wurden allerdings in den meisten Versuchen nur über kurze Zeit verfolgt, so daß diese nicht in so vielen Richtungen ausgewertet werden können wie die früheren Versuche. So war z. B. nur bei wenigen Tieren die Änderung der Blutfarbstoffkonzentration lange genug verfolgt worden, um das Minimum sicher festzustellen.

Alle Versuche waren für die Bestimmung der Stärke der Erhöhung der Hämiglobinkonzentration auszuwerten. Die Hämiglobinkonzentration stieg im Mittel um $5{,}6 \pm 0{,}2$ g/100 ml an. Die maximale Konzentration entsprach dann im Mittel $47 \pm 1{,}5\%$ des Gesamtblutfarbstoffs. Die entsprechenden Werte für die früheren Untersuchungen betrugen $6{,}6 \pm 0{,}9$ g/100 ml Blut und $50 \pm 3\%$.

In 5 Versuchen, die lange genug verfolgt wurden, betrug die Abnahme der Blutfarbstoffkonzentration 4,3 g/100 ml, entsprechend 31,5% der ursprünglichen Konzentration. Heinz-Körper wurden im Mittel an 65% der roten Zellen beobachtet. Geringe Erhöhungen der Verdoglobinkonzentration im Blute traten mehrfach auf.

Die Aufzeichnungen über das Auftreten von nervösen Störungen und den Eintritt des Todes sind leider verlorengegangen.

2. Unbeeinflußte Äthanolwirkung auf Hunde.

Die Wirkung des Äthanols wurde in 24 Versuchen an normalen Hunden untersucht. Den Tieren wurden 3 ml/kg von 98%igem Äthanol mit der gleichen Menge Wasser verdünnt durch die Schlundsonde in den Magen gegeben. Gemessen wurden die Dauer der Seitenlage und die Dauer des Nystagmus. Die Hunde zeigten eine zu nicht geringem Teil durch rassische Eigenschaften bedingte Variation der Empfindlichkeit für Äthanol. Terrier und Schnauzer (4 Tiere) waren offenbar weniger empfindlich und reagierten vornehmlich mit Erregungszuständen von 1—2 Stunden Dauer, während der sie zum Teil sehr wild umherliefen. Die anderen Tiere zeigten früher oder später starke narkotische Wirkungen des Äthanols. Nach einem kurzen Stadium der Erregung, in dem sie meist schon taumelnd umherliefen, gingen sie in Seitenlage, um einzuschlafen oder zunächst noch wach mit unkoordinierten Laufbewegungen zu liegen. Nicht selten wurde der Schlaf auch von Laufbewegungen oder unruhigen Bewegungen des Kopfes unterbrochen. Als Beendigung der Seitenlage wurde der Zeitpunkt gewählt, wo die Tiere wieder normale sitzende oder stehende Haltung einnahmen oder fortgesetzte Versuche umherzulaufen machten, wenn sie dabei auch immer wieder umfielen. Die Seitenlage wurde im Mittel $3^1/_2 \pm {}^1/_2$ Stunde lang eingenommen.

Nystagmus trat bei 70% der Tiere ein und dauerte im Mittel zwei Stunden.

Tabelle 1. *Veränderungen der Blutzellen und Blutfarbstoffe*

Hund	Blutfarbstoffkonzentration g/100 ml Blut		Blutfarbstoff		Rote Zellen Millionen/cmm		Heinz-Körper	
	vor Injektion	nach 2 Tagen	minimale Konzentration g/100 ml	nach Tagen	vor Injektion	nach 2 Tagen	Prozent der roten Zellen	Zeit nach Injektion in Stunden
1	14,0	10,0	8,0	3	6,5	4,0	50	36
2	13,5	11,0	(11,0)		6,3	(5,0)	80	30
3	14,5	(12,5)	(12,0)	1	6,0	(5,3)	35	30
4	15,6	14,0	13,5	1	5,6	5,3	20	20
5	14,5	13,5	(13,5)	2	5,9	6,0	22	20
6	12,6	8,0	8,0	2	5,4	3,5	80	30
	14,7	12,5	9,0	4	5,3	4,5	100	30
7	12,6	9,0	(9,0)	2	5,3	3,8	80	48
	11,3	8,0	(8,0)	2	5,4	4,0	90	24
8	13,0	10,5	10,5)	2	5,6	3,5	70	30
	11,4	9,0	8,5	$2^1/_2$	5,2	3,1	100	20
9	8,5	6,0	(6,0)	2	3,3	2,5	65	30
10	11,6	7,5	(7,5)	2	5,0	3,7		
11	19,3	14,7	(14,7)	2			50	48
12	13,1	9,5	(9,5)	2	5,7	4,6	78	48
13	16,3	13,0	(13,0)	2			28	24
14	13,4	11,8			6,0	5,3	80	48
	12,3	11,8			5,7	4,7		
15	14,1	9,5			5,8	4,1		
16	14,4	13,5	13,2	1				
	11,5	7,0	(7,0)	2			84	36
	11,5	10,2						

Die Dauer der Äthanolwirkung überhaupt konnte nicht genau erfaßt werden. Besonders bei Hunden, die durch vorherige akute oder chronische m-Dinitrobenzolwirkung bereits geschädigt waren, konnte das Ende narkotischer Äthanolwirkung nicht festgestellt werden 24 Stunden nach der Eingabe des Äthanols waren in keinem Falle irgendwelche Wirkungen, die einwandfrei dem Äthanol zuzuschreiben wären, zu beobachten.

3. Äthanolwirkung bei Hunden, die chronisch oder akut mit m-Dinitrobenzol vergiftet wurden.

Mit der Äthanolwirkung an normalen Hunden wurde die Wirkung an 5 Hunden verglichen, die mit täglichen Dosen von 0,2—1,0 mg/kg m-Dinitrobenzol chronisch vergiftet worden waren. Die Wirkung von 3 ml/kg Äthanol wurde im Laufe der Vergiftung wiederholt geprüft. Dosis und Dauer der Behandlung mit m-Dinitrobenzol ist aus Tabelle 2 zu ersehen. Dort sind auch einige Angaben über Änderung der Blutfarbstoffkonzentration, Anteil der roten Zellen mit Heinz-Körpern und Eintritt nervöser Störungen zusammengestellt.

Äthanolwirkung trat bei allen Tieren ein, erreichte aber nicht regelmäßig eine genügende narkotische Stärke, um Seitenlage herbeizuführen. In mehreren Versuchen trat nur „Trunkenheit" ein, die

von Hunden durch die Wirkung von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol.

Weiße Zellen			Hämiglobin			Anteil des Hämiglobins am Gesamtblutfarbstoff in %	Verdoglobin	
je cmm vor der Injektion	höchste Konzentration	Zeit nach der Injektion Stunden	Höchste Konzentration g/100 ml	Zeit nach Injektion Stunden	Rückkehr zur Norm nach Stunden		höchste Konzentration g/100 ml	Zeit nach Injektion Stdn.
7400	11600	12	5,2	12	70	41		
4400	9000	8	5,0	10	(50)	42	0,95	12
8800	9300	8	6,0	12		51	0,85	12
3400	7500	6	6,5	12	45	45	0,8	10
			5,3	12		34	0,8	30
8000	12500	30	4,7	12	40	43	0,6	12
			7,2	12	70	48	1,1	13[1]
9400	10200	12	5,5	12	48	50		
7400	9200	10	4,8	10	30	46	0,6	12[2]
			4,4	10	48	38	0,6	12
			4,7	16	40	43	1,1	30[3]
			3,8	9	36	48	0,4	30[4]
			5,1	8		50	0,75	30
			6,2	12		36	0,8	12
			4,9	12		45	0,75	12
			8,3	12		52	0,8	24
			5,4	12		46	0,8	12
			5,8	12		49	0,8	12[5]
			5,7	12		58	0,7	12
			(1,2)	12			0,6	12
			6,4	6		62	0,7	12[6]
			6,1	8		55	0,5	12[7]

[1] Zweite Vergiftung 4 Wochen nach der ersten. [2] Zweite Vergiftung 8 Wochen nach der ersten. [3] Zweite Vergiftung 3 Wochen nach der ersten. Eine und 2 Wochen vor der zweiten Vergiftung je 2 mg/kg Phosphor subkutan. [4] 6 Wochen lang vor der Vergiftung 3mal je 1,0 mg/kg danach 4mal je 1,5 mg/kg Phosphor in wöchentlichen Abständen injiziert. [5] Zweite Vergiftung 3 Wochen nach der ersten. [6] Zweite Vergiftung 14 Tage nach der ersten. [7] Dritte Vergiftung 18 Tage nach der zweiten.

sich im taumelnden Gang und zum Teil auch in Erregungen äußerte. Die Dauer der Seitenlage betrug im Mittel $2 \pm {}^1/_2$ Stunde und die Dauer des Nystagmus, der in diesen Versuchen seltener beobachtet wurde als bei den Kontrolltieren, im Mittel ${}^1/_2$ Stunde.

Der Vergleich mit den Daten normaler Tiere läßt erkennen, daß bei den chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Hunden die Äthanolwirkung nicht verstärkt war. Wenn man dem beobachteten Unterschied bereits eine Bedeutung beimessen will, so wäre anzunehmen, daß die Äthanolwirkung bei chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Hunden sogar schwächer als bei normalen Tieren ist.

Die ebenfalls in der Tabelle angegebenen Daten über die chronische m-Dinitrobenzolwirkung können unsere früheren Untersuchungen[8] nur wenig ergänzen. Beachtenswert erscheint die geringe Empfindlichkeit des Hundes 2, der zunächst 4 Vergiftungen mit je 10 mg/kg m-Dinitrobenzol überlebte und dann monatelang tägliche Dosen von 0,2, 0,4

[8] Kiese, M.: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 505 (1949).

Tabelle 2. *Wirkung von 3 ml/kg Äthanol auf Hunde,*

Hund	Gewicht kg	Vorbehandelt mit m-Dinitrobenzol: Dosis mg/kg/Tag	Vorbehandelt mit m-Dinitrobenzol: Dauer Tage	Blutfarbstoff g/100 ml: vorher	Blutfarbstoff g/100 ml: zur Zeit der A.-Wirkung	Heinz-Körper Prozent der roten Zellen	Weiße Zellen je cmm Blut: vorher	Weiße Zellen je cmm Blut: zur Zeit der A.-Wirkung
17	19,2	1,0	37	12,0	9,0	35	5000	7500
			42		11	15		8000
18	6,5	0,4	59 (9 Tg. Unterbr.)	13,0		15		
		1,0	37			20		
		0,4	59					
		1,0	81					
19	22,0	0,2	34	16,0	14,0	4	6000	7500
		0,2	85		13,0	5		7500
		0,4	42		12,0	10		
20	22,0	1,0	15	17,0	13,0	15	6000	8500
Nach Pause von 37 Tagen								
		1,0	40					
21	6,5	0,2	47	17,5	15,0	10	6500	7000
		0,2	85		13,0			
		0,2	105					
		0,4	52					
		0,2	105					
		0,4	220					
		0,2	105					
		0,4	227					
		1,0	150					
22	23	1,0	50					

und schließlich 1,0 mg/kg m-Dinitrobenzol ertrug. Allerdings erhielt der Hund gleichzeitig antianämisches Leberextrakt, dem aber nach anderen Versuchen kein wesentlicher Einfluß auf die m-Dinitrobenzolwirkung zukommt.

Vier Hunden wurden 27—50 Stunden nach der Injektion von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol 3 ml/kg Äthanol mit der Schlundsonde verabreicht. Bei 3 Tieren verlief die Äthanolwirkung ganz wie bei normalen Tieren. Das 4. Tier, das das Äthanol 27 Stunden nach dem m-Dinitrobenzol erhalten hatte, zeigte 3 Stunden nach der Äthanolgabe plötzlich starke Erregungen, die sich bis zu Krämpfen steigerten. Noch 2 Tage nach der Äthanolgabe war das Tier sehr matt. Die Symptome entsprachen mehr denen der m-Dinitrobenzolwirkung, und sofern sie nicht überhaupt ganz unabhängig von der Äthanolwirkung auftraten, war ihr Auftreten durch das Äthanol allenfalls begünstigt.

4. Wirkung von 10 mg/kg m-Dinitrobenzol bei chronischer Vergiftung von Hunden mit Äthanol.

Drei Hunde wurden chronisch mit Äthanol vergiftet, und zwar einer mit täglichen Dosen von 1 ml/kg, die beiden anderen mit Dosen von 3 ml/kg.

die chronisch mit m-Dinitrobenzol vergiftet sind.

Beginn nervöser Störungen nach Tagen	Dauer der Seitenlage nach Äthanol Stunden	Dauer des Nystagmus Stunden	Bemerkungen
30	5	—	
	4	4	11 Tage lang vor Äthanol täglich 1 ml Pernaemyl forte
20	keine Seitenlage		
	keine Seitenlage		
	keine Seitenlage		
	4		
15	3	1	Äthanol 10 Tage nach Beendigung der m-Dinitrobenzolgabe
11	3	1	
	5		Hat in Abständen von 3—4 Wochen 4 akute Vergiftungen mit 10 mg/kg durchgemacht, letzte 4 Wochen vor Beginn der chronischen
	keine Seitenlage		
	4	1	
	1	—	Seit 170 Tagen 2mal wöchentlich 1 ml Pernaemyl forte subkutan
			2mal wöchentlich 1,0 Pernaemyl.
40	keine Seitenlage	—	Vorher 2 Vergiftungen mit 10 mg/kg, letzte 2 Wochen vorher

Der mit 1 ml/kg täglich vergiftete Hund war nach der Äthanoldosis ein wenig müde und lief lahm. Nach 4 Monate langer Behandlung wurde eine Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol durchgeführt, die ganz ähnlich der an nicht mit Äthanol behandelten Hunden verlief. Nachdem weitere $1^1/_2$ Monate täglich 1 ml/kg Äthanol verabreicht war, wurde noch eine Vergiftung mit 10 mg/kg m-Dinitrobenzol vorgenommen. Etwa 24 Stunden nach der Injektion des m-Dinitrobenzols traten Krämpfe auf, die mehrere Tage anhielten. Nach 6 Tagen besserte sich der Zustand des Tieres, doch trat nach 14 Tagen der Tod ein.

Den beiden Tieren, die täglich 3 ml/kg erhielten, wurden 4 Wochen nach Beginn der Vergiftung zum erstenmal 10 mg/kg m-Dinitrobenzol injiziert und nach weiteren 8 Wochen zum zweitenmal. Während ein Hund bei beiden Vergiftungen keine stärkeren nervösen Störungen zeigte, trat bei dem anderen spastisch ataktischer Gang auf, jedoch keine Krämpfe. Die Störung hielt mehrere Tage an. Die zweite Vergiftung mit m-Dinitrobenzol verlief unter starken nervösen Störungen zum Tode. Sechs Stunden nach der Injektion von m-Dinitrobenzol traten Lähmungen auf, die das Laufen bereits sehr erschwerten. Bald

danach konnte sich das Tier aus der Seitenlage nicht mehr aufrichten, nach 12 Stunden traten Krämpfe auf, und nach 3 Tagen starb der Hund.

Die Hämiglobinbildung zeigte in Stärke und Verlauf keine Abweichungen von der bei Tieren, die keinen Alkohol erhalten hatten. Bei den 6 Versuchen wurden im Mittel $6{,}5 \pm 0{,}4$ g/100 ml Hämiglobin als höchste Konzentration erreicht.

5. m-Dinitrobenzolwirkung bei Ratten nach Vorbehandlung mit Äthanol.

Die Beeinflussung der Wirkung des m-Dinitrobenzols durch Äthanol bei Ratten wurde an der tödlichen Wirkung gemessen. Die Wirkungen des m-Dinitrobenzols auf das Blut wurden nicht genauer verfolgt. Nervöse Störungen traten nach tödlichen Dosen m-Dinitrobenzol bei Ratten nicht so regelmäßig auf wie bei Hunden. Als Dosis wurden 40 mg/kg m-Dinitrobenzol gewählt, die etwa 20% der Tiere töteten. Bereits 1 Stunde nach der subkutanen Injektion der 2%igen öligen Lösung wurden die Tiere zyanotisch. Nach 4 Stunden betrug der Hämiglobingehalt im Mittel 74% des Gesamtblutfarbstoffs und nach 7 Stunden noch 46%. Um die 4. Stunde waren die Tiere, die überlebten, am stärksten geschädigt und lagen in der Mehrzahl stark zyanotisch und dyspnoisch auf der Seite. Bei den Tieren, die nicht überlebten, trat der Tod zwischen der 2. und 4. Stunde und nur ausnahmsweise noch nach der 6. Stunde ein.

Zur Prüfung des Einflusses des Äthanols wurden einer Gruppe von 17 Ratten, die nur wenig über 100 g wogen, täglich 2 ml/kg Äthanol zusammen mit der 3fachen Menge Wasser durch die Schlundsonde in den Magen gegeben. Durch diese Dosis trat Beruhigung und oft auch Schlaf, nie stärkere Narkose mit Seitenlage ein. Im Verlaufe der Behandlung, die 7 Wochen durchgeführt wurde, zeigte sich eine gewisse Gewöhnung, nur noch einzelne Tiere schliefen nach der Alkoholdosis. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde nicht sichtlich beeinträchtigt, sie wiesen die gleiche Gewichtszunahme auf wie Kontrolltiere. Drei Tage vor der Injektion von m-Dinitrobenzol wurde die Gabe von Äthanol unterbrochen.

Eine zweite Gruppe von 22 Ratten erhielt 3 Stunden vor der Injektion von 40 mg/kg m-Dinitrobenzol je 3 ml/kg Äthanol mit der gleichen Menge Wasser durch die Schlundsonde, um die gleichzeitige Wirkung von Äthanol und m-Dinitrobenzol zu prüfen.

Schließlich wurde an einer dritten Gruppe von 10 Ratten der Einfluß einer kurz vorhergehenden starken Alkoholwirkung geprüft. Dazu erhielten 10 Ratten je 10 ml/kg Äthanol mit der gleichen Menge Wasser.

Tabelle 3. *Tödliche m-Dinitrobenzolwirkung auf Ratten nach vorheriger Wirkung von Äthanol.*

Gruppe	Zahl der Tiere	Vorbehandlung	Zahl der toten Tiere nach 2 Stunden	3 Stunden	6 Stunden	Gesamtzahl der toten Tiere	Anteil der toten Tiere an der Gesamtzahl in %	Bemerkungen
1	17	7 Wochen täglich 2 ccm/kg Äthanol	2	4	5	5	29	9 Tiere in Seitenlage
2	22	3 Stunden vor m-Dinitrobenzol 3 ccm/kg Äthanol	7	10	12	12	55	Alle Tiere in Seitenlage
3	10	24 Stunden vor m-Dinitrobenzol 10 ccm/kg Äthanol	1	1	6	6	60	Alle Tiere in Seitenlage
4	22	—	2	3	4	4	18	2 der überlebenden Tiere in Seitenlage

Bald danach trat tiefe Narkose ein. Nach 11 Stunden war die Äthanolwirkung bis auf eine geringe Depression geschwunden, und nach 24 Stunden wurden jedem Tier 40 mg/kg m-Dinitrobenzol injiziert.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Sie zeigen, daß die Toxizität einer Dosis von 40 mg/kg m-Dinitrobenzol sowohl durch die chronische Vorbehandlung mit kleinen Dosen Äthanol wie durch das gleichzeitige oder kurz vorhergehende Einwirken einer größeren Dosis erheblich gesteigert wird.

6. Äthanolwirkung auf chronisch mit m-Dinitrobenzol vergiftete Ratten.

In Anlehnung an die Dosierung des m-Dinitrobenzols bei chronischen Vergiftungen von Ratten für andere Untersuchungen[9] wurden 7 Ratten 6 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan injiziert. Vier Ratten waren nach dieser Zeit äußerlich völlig unverändert und drei zeigten leichte Bewegungsstörungen. 24 Stunden nach der letzten Injektion von m-Dinitrobenzol erhielten die Ratten 3 ml/kg Äthanol durch die Schlundsonde. Der Ablauf der Äthanolwirkung im Vergleich mit dem bei einer Gruppe von Kontrolltieren ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Äthanolwirkung ist danach an den chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tieren stärker und anhaltender als bei den Kontrolltieren. Allerdings sind die Symptome wohl nicht ausschließlich auf das Äthanol zurückzuführen. Offenbar wird durch das Äthanol auch das Auftreten von Symptomen erleichtert, die mehr charakteristisch für die m-Dinitrobenzolwirkung sind wie Extremitätenlähmungen und Krämpfe.

[9] Kiese, M., u. G. Siems: Arch. exper. Path. (D.) **206**, 528 (1949).

Tabelle 4. *Wirkung von 3 ml/kg Äthanol auf Ratten, die 6 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan erhalten hatten und bei Ratten, die nicht mit m-Dinitrobenzol behandelt worden waren.*

Zeit nach der Äthanolgabe	7 Ratten, die 6 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten	7 Ratten, die kein m-Dinitrobenzol erhalten hatten
7 Min.	2 Tiere in Seitenlage, die anderen sehr ruhig	Unverändert
20 Min.	2 Tiere in tiefer Narkose, 2 Tiere in Seitenlage, 3 Tiere taumeln unruhig umher	Alle Tiere ruhig Beim Einschlafen
50 Min.	2 Tiere weiter in tiefer Narkose, 1 Tier dyspnoisch, Exophthalmus, liegt gekrümmt, hintere Extremitäten gelähmt 1 Tier schlägt rhythmisch mit dem Kopf auf den Boden, von Zeit zu Zeit krampfartige Drehung um die Körperachse, die anderen Tiere taumeln umher	Tiere schlafen, sind leicht erweckbar und zeigen dann keine besonderen Störungen
90 Min.	Keine wesentlichen Veränderungen. Narkotische Wirkung im allgemeinen offenbar etwas geringer	Schlaf oft durch spontanes Erwachen unterbrochen
9 Stunden	Tier mit Exophthalmus noch gelähmt. 1 Tier liegt dyspnoisch auf dem Bauch, 1 Tier läuft mit gekrümmtem Rücken und steifen Beinen umher, 2 Tiere haben leichte Lähmungen, 1 Tier taumelt umher, 1 Tier ohne Symptome	Tiere wieder in normalem Zustand

Ganz ähnliche Beobachtungen über die Äthanolwirkung bei chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tieren hatten Jung und Klempau[10] gemacht. Ratten hatten 5 Wochen lang jeden 2. Tag 10 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan erhalten. Im Laufe dieser Zeit waren einige Tiere gestorben, bei anderen waren stärkere nervöse Störungen aufgetreten. Fünf Tiere machten einen ungeschädigten Eindruck und erhielten 0,25 ml Äthanol je Tier subkutan bei einem Gewicht von wenig über 100 g. Auch bei diesen Tieren traten unter der Äthanolwirkung Seitenlage, spastische Lähmungen, starke Übererregbarkeit, Krämpfe und bei einem Tiere der Tod ein. Noch nach 24 Stunden waren die Lähmungen nicht ganz geschwunden. Demgegenüber schliefen Kontrolltiere, die nicht mit m-Dinitrobenzol behandelt worden waren, nach kurzem Taumeln ein, waren aus dem Schlaf erweckbar und boten nach 7 Stunden keine Zeichen narkotischer Wirkung mehr.

7. Wirkung von Propanol und Butanol sowie Acetaldehyd auf chronisch mit m-Dinitrobenzol vergiftete Ratten.

Um zu untersuchen, ob die im vorigen Abschnitt beschriebene Wirkung des Äthanols spezifisch ist, wurden andere narkotisch wirkende

[10] Jung, F. u. I. Klempau: Unveröffentlichte Untersuchungen. Berlin 1943.

Tabelle 5. *Wirkung von n-Propanol in Dosen von 1 ml/kg auf Ratten, die 6 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten.*

Zeit nach der Propanolgabe	13 Ratten, die 6 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten	12 Ratten, die kein m-Dinitrobenzol erhalten hatten
5 Min.	1 Tier in Seitenlage, 1 in tiefem Schlaf, 2 Tiere Gehstörungen	Unverändert
10 Min.	1 Tier tot, 1 Tier Seitenlage ohne Kornealreflex, 1 Tier stark taumelnd, 1 Tier Extremitätenlähmungen	1 Tier geringe Atmungserregung
20 Min.	1 weiteres Tier tot, 2 Tiere in Seitenlage, 3 Tiere mit Extremitätenlähmungen, 1 Tier taumelnd	Unverändert
40 Min.	1 weiteres Tier tot, 4 Tiere in Seitenlage mit angestrengter Flankenatmung, zwei Tiere erregt, 4 Tiere unverändert	Unverändert
1 Stunde	2 weitere Tiere tot, Zustand der anderen wie nach 40 Min.	
4 Stunden	Zustand der Tiere etwa wie nach 1 Stunde	2 Tiere schläfrig
24 Stunden	Überlebende Tiere im gleichen Zustand wie vor der Alkoholwirkung	Normales Verhalten

Alkohole, n-Propanol, iso-Propanol und n-Butanol, sowie der Acetaldehyd in ihrer Wirkung auf chronisch mit m-Dinitrobenzol vergiftete Ratten geprüft. Die Propanole und der Acetaldehyd verhielten sich ganz ähnlich wie das Äthanol, indem sie bei den mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tieren stärker und länger wirkten als bei nicht vergifteten Kontrolltieren und außerdem ebenfalls m-Dinitrobenzolwirkungen zur Auslösung brachten. Die Wirkung des Butanols war bei den mit m-Dinitrobenzol vergifteten Ratten und den Kontrolltieren nicht merklich verschieden.

Die Wirkung des n-Propanols wurde an 13 Ratten, die 6 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten, und an 12 unbehandelten Kontrolltieren geprüft. Von den vergifteten Tieren wiesen vor der Propanolwirkung 4 keine Störungen auf, 6 waren übererregbar und schrien bei Berührungen auf, 2 hatten einen stärkeren Tremor des Kopfes und 1 leichte Lähmungen der Extremitäten. Der Ablauf der Wirkung des n-Propanol ist in Tabelle 5 beschrieben. Das n-Propanol wurde in einer Dosis von 1 ml/kg zusammen mit der 4fachen Menge Wasser durch die Schlundsonde verabreicht. Der Unterschied der Reaktion der normalen Tiere und der mit m-Dinitrobenzol vorbehandelten war beim n-Propanol noch stärker als beim Äthanol. Die 5 getöteten Tiere hatten vor der Einwirkung des Propanols sichtbare nervöse Störungen.

Zur Prüfung der Wirkung des iso-Propanols wurden 6 Ratten, die 5 Wochen lang täglich 5 mg-/kg m-Dinitrobenzol subkutan erhalten hatten, und 4 normale Kontrolltiere verwendet. Drei der mit m-Dinitrobenzol behandelten Tiere wiesen vor der Propanolwirkung keinerlei

Tabelle 6. *Wirkung von Acetaldehyd in Dosen von 0,5 ml/kg auf Ratten, die 5 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten.*

Zeit nach der Gabe von Acetaldehyd	13 Ratten, die 5 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten	14 Ratten, die kein m-Dinitrobenzol erhalten hatten
3 Min.	2 Tiere mit Lähmungen und Krämpfen, 3 Tiere haben stärkere Störungen der hinteren Extremitäten, 1 Tier in Seitenlage, 3 Tiere taumeln umher	
5 Min.	2 Tiere mit starker Erregung der Atmung, 3 Tiere in Seitenlage, 3 Tiere taumeln umher mit starken Störungen der hinteren Extremitäten	1 Tier schläft 1 Tier läuft hochbeinig umher
10 Min.	4 Tiere in Seitenlage mit Krampfanfällen, 2 Tiere mit starker Erregung der Atmung, 5 Tiere taumeln, vorübergehend in Seitenlage	1 Tier schläft
20 Min.	Von den 4 Tieren in Seitenlage 1 gestorben. 1 Tier mit starker Lähmung der hinteren Extremitäten, 3 Tiere stark dyspnoisch, 2 Tiere schläfrig, 1 Tier hochbeinig	3 Tiere schlafen
35 Min.	2 weitere Tiere tot, 5 Tiere stark dyspnoisch, 1 Tier schläfrig	2 Tiere schlafen
1 Stunde	6 Tiere noch leicht narkotisch beeinflußt mit geringer Dyspnoe	Alle Tiere wach und von normalem Verhalten
4 Stunden	1 Tier leicht taumelnd, 2 Tiere noch mit leichten Lähmungen der hinteren Extremitäten	
24 Stunden	Zustand der Tiere wie vor der Acetaldehydwirkung	

Störungen auf, während die anderen 3 leichte Gangstörungen hatten. iso-Propanol wurde in einer Dosis von 1 ml/kg zusammen mit der 4fachen Menge Wasser 24 Stunden nach der letzten Injektion von m-Dinitrobenzol durch die Schlundsonde verabreicht. Während die Kontrolltiere in ihrem Verhalten unter der Wirkung des Propanols keine Veränderung erkennen ließen, traten bei den mit m-Dinitrobenzol behandelten Tieren narkotische Wirkungen und Lähmungen der Extremitäten ein. 24 Min. nach der Gabe des Propanols waren 2 Tiere in Seitenlage, 1 hatte Extremitätenlähmungen und 1 war sehr erregt. Die Wirkung des iso-Propanols war nur schwach aber anhaltend, so daß auch noch nach 24 Stunden leichte Veränderungen erkennbar waren.

Die Wirkung des n-Butanols war erheblich stärker und von längerer Dauer als die der Propanole. Bei 13 Ratten, die 7 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan erhalten hatten, und 14 Kontrolltieren war die Wirkung sehr ähnlich. Eine ausführlichere Beschreibung der Einzelheiten erscheint darum nicht nötig. 20 Min. nach einer Dosis von 1 ml/kg n-Butanol, durch die Schlundsonde mit der 4fachen Menge Wasser verabreicht, waren bei der Mehrzahl der Tiere narkotische

Wirkungen bereits deutlich und nach 1 Stunde war ein Teil der Tiere in fester Seitenlage. Die Wirkung nahm nur langsam wieder ab und nach 24 Stunden waren noch bei Tieren beider Gruppen Störungen vorhanden.

Größere Unterschiede in der Wirkung wurden wieder beim Acetaldehyd beobachtet. 13 Ratten, die 5 Wochen lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol erhalten hatten, wurden mit 14 nicht mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tieren verglichen. Von den mit m-Dinitrobenzol behandelten Tieren hatten vor der Acetaldehydwirkung 3 einen unsicheren Gang, 5 erschienen nicht mehr ganz so lebhaft wie zuvor, die restlichen waren unverändert. Alle Tiere erhielten 0,5 ml/kg Acetaldehyd in wäßriger Lösung 24 Stunden nach der letzten Injektion von m-Dinitrobenzol. Der Verlauf der Wirkung ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

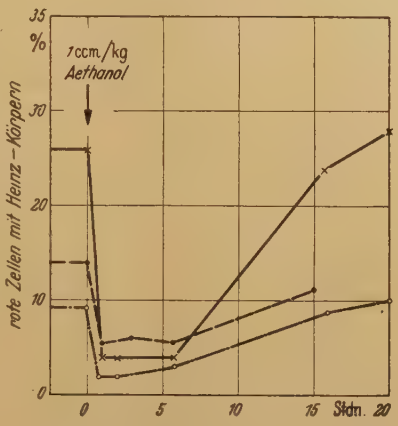


Abb. 1. Abnahme der Zahl der roten Zellen mit Heinz-Körpern bei 3 Hunden nach Gabe von 1 ml/kg Äthanol durch die Schlundsonde. Heinz-Körper durch vorherige Injektion von m-Dinitrobenzol erzeugt.

Während von den 14 Kontrolltieren nur 3 Tiere in einen kurzen Schlaf versetzt wurden, wurden von den mit m-Dinitrobenzol vorbehandelten Tieren 5 getötet. Ist somit der Acetaldehyd bei den mit m-Dinitrobenzol vorbehandelten Tieren wesentlich stärker wirksam, so sind doch ebenso wie beim Äthanol und n-Propanol die beobachteten Wirkungen keine reinen Acetaldehydwirkungen, sondern ganz wesentlich m-Dinitrobenzolwirkungen.

8. Das Verhalten der Heinz-*Körper unter der Alkoholwirkung.*

Bei Hunden, die vor der Gabe von Äthanol m-Dinitrobenzol erhalten und infolgedessen rote Zellen mit Heinz-Körpern im Blute hatten, wurde nach der Äthanolgabe regelmäßig eine Verminderung der Konzentration der Zellen mit Heinz-Körpern beobachtet. Die Verminderung trat sehr schnell nach der Aufnahme des Alkohols ein und schwand nach mehreren Stunden wieder. In Abb. 1 ist der Ablauf dieses Phänomens dargestellt. Äther hatte keine entsprechende Wirkung.

Die Konzentration des Blutfarbstoffs und der roten Zellen nahm unter der Äthanolwirkung nicht ab, in einigen Versuchen sogar ein wenig zu.

Wurde dem Blut, das rote Zellen mit Heinz-Körpern enthielt, in vitro Äthanol zugesetzt, so wurde die Färbbarkeit der Heinz-Körper

mit Nilblau oder Kresylblau durch das Äthanol vermindert und so ebenfalls eine „Verminderung" der Heinz-Körper erzielt. Allerdings waren dazu höhere Äthanolkonzentrationen erforderlich. Konzentrationen unter 1% Äthanol waren ohne Einfluß auf die Darstellung der Heinz-Körper in vitro.

Besprechung.

Die Versuche an Hunden lassen keine ganz sicheren Schlüsse auf eine gegenseitige Beeinflussung der Wirkung von m-Dinitrobenzol und Äthanol zu. Die narkotische Wirkung des Äthanols war bei Hunden, die chronisch mit m-Dinitrobenzol vergiftet waren, sicher nicht stärker als bei normalen Tieren.

Es traten zwar bei 2 von 3 Tieren nach Wiederholung der Injektion Krämpfe und Tod ein, da wir aber die gleiche Wirkung des m-Dinitrobenzols in früheren Versuchen[7] auch ohne vorherige Behandlung der Tiere mit Alkohol beobachtet hatten, können wir aus den Versuchen nicht sicher auf eine Verstärkung der m-Dinitrobenzolwirkung durch chronische Alkoholvergiftung schließen.

Eine gegenseitige Beeinflussung der Wirkung des m-Dinitrobenzols und des Äthanols ist jedoch in den Versuchen an Ratten nachzuweisen, wo einerseits eine größere Toxizität des m-Dinitrobenzols für chronisch mit Äthanol vergiftete Ratten und andererseits eine stärkere Wirkung des Äthanols bei chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tieren nachzuweisen ist. Sicher handelt es sich in beiden Fällen zum Teil um eine einfache Addition von Schädigungen am Zentralnervensystem. Es ist jedoch auffällig, daß Äthanol wie auch n-Propanol und Acetaldehyd an den chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Tieren nicht nur eine stärkere und länger dauernde narkotische Wirkung haben, sondern auch Symptome auslösen wie Krämpfe und Lähmungen, die bei ihrer alleinigen Wirkung nicht beobachtet werden, wohl aber beim m-Dinitrobenzol. Es scheint hier eine gegenseitige „Sensibilisierung" der Gifte in der Wirkung auf das Zentralnervensystem vorzuliegen, von deren wesentlichen Vorgängen wir allerdings noch keine Vorstellung haben.

Um die bei vielen Tieren vor der Alkoholwirkung noch latente Schädigung des Zentralnervensystems, die dann durch die veränderte Alkoholwirkung sichtbar wurde, nachzuweisen, wurden noch andere zusätzliche Wirkungen auf das Zentralnervensystem angewandt. So ertrugen chronisch mit m-Dinitrobenzol vergiftete Tiere Sauerstoffmangel schlechter als Kontrolltiere. Von 20 Ratten, die 3 Monate lang täglich 5 mg/kg m-Dinitrobenzol subkutan erhalten hatten, zeigten 13 Tiere in (quasi) 10000 m Höhe schon nach 5 Min. starke Störungen der Atmung, während von 17 Kontrolltieren nur 5 zur gleichen Zeit in demselben Maße geschädigt waren. Da bei den Tieren die Blutfarbstoffkonzentration, die für die Höhenfestigkeit mitbestimmend ist, nicht

gemessen war, ist das Ergebnis dieser Versuche jedoch nicht ganz eindeutig und soll darum nicht ausführlicher dargestellt werden.

Ob bei der Ratte die Alkohole auch andere Wirkungen des m-Dinitrobenzols verstärkten, wurde nicht untersucht. Beim Hunde wurde ein Einfluß des Äthanols auf die Hämiglobinbildung durch m-Dinitrobenzol ähnlich dem auf die Hämiglobinbildung durch Anilin nicht beobachtet.

Die wahre — oder nur scheinbare — Verminderung der roten Zellen mit Heinz-Körpern im Blute durch die Wirkung des Alkohols ist noch nicht einwandfrei zu deuten. Eine Störung der Färbung der Heinz-körper durch das Äthanol ist am wahrscheinlichsten, wenn sie in vitro auch erst durch wesentlich höhere Konzentrationen nachzuweisen ist. Würde das Äthanol — was ebenfalls denkbar wäre — die Elimination der roten Zellen mit Heinz-Körpern beschleunigen, so müßte bei der zum Teil erheblichen Abnahme der Heinz-Körper eine Verminderung der Konzentration roter Zellen eintreten, was nicht zutrifft. Auch wäre die schnelle Rückkehr auf den vorherigen Zustand dann schwer zu verstehen.

Der Nachweis einer gegenseitigen Beeinflussung der Wirkungen von m-Dinitrobenzol und Äthanol dürfte auch von gewissem praktischem Interesse sein und eine Grundlage für die Beurteilung entsprechender gewerbetoxikologischer Beobachtungen bilden.

Zusammenfassung.

An Hunden und Ratten wurde die m-Dinitrobenzolwirkung bei chronischer Alkoholvergiftung und die Alkoholwirkung bei chronischer m-Dinitrobenzolvergiftung untersucht. Während bei Hunden eine Änderung der Wirkung des m-Dinitrobenzols und Äthanols unter diesen Bedingungen nicht ganz sicher nachgewiesen werden konnte, wurden bei Ratten Reaktionen beobachtet, die eine „Sensibilisierung" der beiden Gifte für einander in ihrer Wirkung auf das Zentralnervensystem wahrscheinlich machen.

Chronisch mit Äthanol vergiftete Ratten waren für tödliche Dosen von m-Dinitrobenzol empfindlicher als normale.

An chronisch mit m-Dinitrobenzol vergifteten Ratten hatte Äthanol eine stärkere und längere narkotische Wirkung und löste vorher nicht in Erscheinung tretende Störungen am Zentralnervensystem aus, wie Lähmungen und Krämpfe, die für die m-Dinitrobenzolwirkung charakteristisch sind.

n-Propanol, iso-Propanol und Acetaldehyd, nicht n-Butanol hatten eine ähnliche, zum Teil noch stärkere Wirkung als Äthanol.

Bei Hunden wurde unter der Wirkung des Äthanols eine Verminderung der roten Zellen mit Heinz-Körpern im Blute beobachtet. Die Verminderung wurde als nur scheinbar und durch eine Hemmung der Färbung der Heinz-Körper bedingt angenommen.

Aus dem Institut für Hirnforschung und allgemeine Biologie Neustadt/Schwarzw.
(Direktor: Prof. Dr. O. Vogt).

Organveränderungen bei E-avitaminotischen Ratten*.

Von

Werner Ruppel.

Mit 14 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Juli 1948.)

Evans und Bishop beobachteten im Jahre 1922 bei Ratten, die eine aus einer quantitativ ausreichenden Menge von Fett, Eiweiß, Kohlenhydraten, Mineralsalzen und einem Zusatz der seinerzeit bekannten Vitamine (A, B, C und D) bestehende Kost erhielten, nach einigen Monaten Veränderungen am Genitalsystem: Bei den trächtigen Weibchen starben die Foeten ab und wurden im Uterus resorbiert; bei den Männchen trat Oligospermie, später Azoospermie auf. Ein Zusatz von bestimmten grünen Gemüsen oder pflanzlichen Ölen verhinderte das Auftreten der Sterilität und bewirkte bei den Weibchen, die zwar noch konzipieren, ihre Jungen aber nicht austragen konnten, wieder einen normalen Gestationsverlauf. Evans und seine Mitarbeiter konnten zeigen, daß der ätherische Extrakt dieser Gemüse oder der unverseifbare Anteil des Weizenkeimöls oder Baumwollsamenöls den Antisterilitätsfaktor — das Vitamin E — enthält. Bei der Isolierung dieses Stoffes kamen Evans, Emerson und Emerson (1936) zu zwei kristallinen Substanzen, die sie α- und β-Tocopherol nannten. Karrer gelang im Jahre 1938 die Synthese dieser Stoffe, deren biologische Wirkung Demole nachwies. Gaben von synthetischem dl-α-Tocopherol vermögen einer Sterilität vorzubeugen oder diese bei E-avitaminotischen Ratten zu heilen.

Durch diese Ergebnisse war die Forschung lange Zeit auf die Bearbeitung der auffallenden Störungen im Fortpflanzungsgeschehen gerichtet. Die Beziehungen zu den verschiedenen Hormonwirkungen wurden wiederholt untersucht. Eine gewisse Wende brachte die Monographie von Einarson und Ringsted (1938), die die Wirkung des Vitamin E-Mangels auf das Nervensystem und die Skelettmuskulatur herausstellte. Seither wird eine primäre allgemeine Stoffwechselwirkung des Vitamin E diskutiert. Diese neueren Arbeiten haben sich also von der ursprünglich etwas einseitigen Orientierung freigemacht.

---

* Die Arbeit wurde ausgeführt auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. H. Meessen, der ihre Ergebnisse auf dem Internistenkongreß in Karlsruhe am 24. 10. 47 kurz mitgeteilt hat.

An morphologischen Veränderungen bei E-Avitaminose wurden zuerst eine Hypertrophie und braune Verfärbung des Uterus beschrieben (Verzár, Martin und Moore, Barrie, Demole, Emerson und Evans). Als Ursache dieser Pigmentierung erkannte Hessler (1941) das Auftreten von amorphen gelbbraunen Schollen innerhalb der glatten Muskelfasern. Entsprechende Beobachtungen machten u. a. auch Demole (1941), Sweeten und Barrie (1943) und Mason und Emmel (1945). Nach de Faria (1946) sollen diese Pigmentschollen Lipofuscincharakter haben, was aber von anderen Untersuchern abgelehnt wurde.

Eine gelblich-braune Pigmentierung des Fettgewebes fanden Granados Mason und Dam (1947), wenn sie in Versuchen an Ratten der Vitamin E-armen Nahrung eine Zulage von 20% Lebertran oder nur der Fraktion der stark ungesättigten Fettsäuren des Lebertrans machten.

Von den endokrinen Drüsen sahen Monnier (1941) u. a. eine Degeneration des Keimepithels der Hoden. Von Barrie (1938) wurde eine Atrophie der Schilddrüse beschrieben, während Bomskov und Schneider (1939) nur eine Ruhigstellung der Schilddrüse beobachteten. Hüter stellte neuerdings (1947) bei E-Hypervitaminosen ein gesteigertes Epithelwachstum fest. Hypophysenveränderungen wurden von Nelson (1933), Mason (1933), Müller und Müller (1937) sowie Escudero, Herrais und Polak (1940) berichtet. Menschik (1948) teilte eine stimulierende Wirkung von Vitamin E auf die Entwicklung des Follikelepithels der Mäuseovarien mit. Giedosz (1938) konnte keinen Einfluß auf die endokrinen Drüsen feststellen. Drummond, Noble und Wright (1939) kamen auf Grund der vorliegenden Literatur und nach eigenen Untersuchungen zu dem Schluß, daß das endokrine System nicht primär für die Veränderungen bei Vitamin-E-freier Ernährung verantwortlich ist.

Veränderungen der Skelettmuskulatur sahen Einarson und Ringsted (1938) bei erwachsenen Ratten, nachdem schon vorher Evans und Burr (1928) Paresen der hinteren Extremitäten bei jungen E-avitaminotischen Ratten gesehen und Goettsch und Pappenheimer (1931) über eine progressive Muskeldystrophie bei Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen berichtet hatten.

Die Befunde über eine Beteiligung des Herzmuskels bei Vitamin E-Mangel sind widersprechend. Bei jungen, von Vitamin-E-arm ernährten Müttern stammenden Ratten konnten Olcott (1938) und ebenso Mackenzie (1942) bei Kaninchen mit Vitamin-E-Mangel keine Veränderungen erkennen. Dagegen berichten Freire (1941) und später Mason und Emmel (1945) sowie Gatz und Houchin (1947) über Myokardschäden.

An den glatten Muskelfasern verschiedenster Organe wurden von verschiedenen Untersuchern nicht ganz übereinstimmende Befunde angegeben. Hessler (1941) sah Pigmentschollen in der Muskulatur von Vagina und Ureter und fand die übrigen Organe (Bronchien, Milz, Arterien usw.) unverändert. Mason und Emmel (1945) fanden Veränderungen der glatten Muskelfasern auch an Tuben, Samenbläschen, Prostata, Ductus deferens, Dünndarm, Bronchien und Venen, ebenso in der Kapsel und den Trabekeln der Milz. In Untersuchungen an Affen konnten Mason und Telford (1947) auch Veränderungen an den Arterien nachweisen.

An Lungen, Leber und Lymphknoten wurden bei E-avitaminotischen Tieren außer einer vermehrten Pigmentierung keine Veränderungen festgestellt Martin und Moore (1939), Mason und Emmel (1945). In der Niere beschrieben schon Martin und Moore (1939) ausgedehnte nephrotische Veränderungen und gelegentlich fibröse Herde, die auch von Mason und Emmel (1945) bei einigen Tieren beobachtet wurden.

Die Befunde am peripheren und zentralen Nervensystem von Einarson und Ringsted sind bestätigt und erweitert durch die Arbeiten von Evans, Emerson und Telford (1938), Demole und Verzár (1939), Martin und Moore (1939),

DEMOLE und PFALZ (1940) sowie von MONNIER (1940/41). Eine seröse Entzündung und Atrophie der Retina wurden von DEMOLE und KNAPP (1941) berichtet.

Für die pathogenetische Bedeutung ihrer Befunde am Zentralnervensystem nahmen EINARSON und RINGSTED an, daß das Vitamin E neurotrop wirke und die neuromuskulären Erscheinungen bei Vitamin-E-Mangel ausschließlich neurogen bedingt seien. MONNIER dachte an eine gleichzeitige Wirkung des Vitamin E sowohl auf das Nervensystem als auch auf die Skelettmuskulatur. Neuere physiologisch-chemische Untersuchungen über den Sauerstoffverbrauch der Skelettmuskulatur bei Vitamin-E-Mangel lassen die Bedeutung einer Muskelstoffwechselstörung in den Vordergrund treten [HOUCHIN und MATILL (1942), KAUNITZ und PAPPENHEIMER (1943)]. Nach den Untersuchungen von AMES (1947) sowie von GOVIER und JETTER (1948) hat Vitamin E bzw. α-Tocopherylphosphatase einen direkt hemmenden Einfluß auf die Diphosphopyridinnucleotidase. Die Stoffwechselwirkung des Vitamin E ist damit in das Stadium einer genaueren Deutung getreten[1]. BORMANN und HEINSEN haben in Stoffwechselversuchen auch am Menschen die Bedeutung des Vitamin E herausgestellt.

Die hier vorgelegten eigenen Untersuchungen über Organveränderungen weißer weiblicher Ratten berücksichtigen das periphere und zentrale Nervensystem nicht; unsere hier erhobenen Befunde müssen einer getrennten Darstellung vorbehalten bleiben. Die Befunde an den übrigen untersuchten Organen dagegen dürften Anlaß sein, zu verschiedenen strittigen Punkten der Vitamin-E-Mangelerscheinungen und ihrer pathogenetischen Deutung Stellung zu nehmen.

Versuchsanordnung.

Zur morphologischen Untersuchung standen uns 14 E-avitaminotische Ratten und 8 Kontrolltiere zur Verfügung[2]. 4—6 Wochen alte weibliche Albinoratten wurden über 4—13 Monate auf eine Vitamin-E-freie Kost gesetzt. Die Versuchsdauer ist aus Tabelle 1 zu ersehen. Bei den Tieren E 8 und E 9 handelt es sich um junge Ratten, die von Vitamin E-arm ernährten Müttern stammen.

Tabelle 1.

Ratte Nr.	Versuchsdauer (Monate)	Ratte Nr.	Versuchsdauer (Monate)
991	4	E 4	$10^1/_2$
925	5	E 5	13
E 1	$5^1/_2$	E 6	13
E 2	$5^1/_2$	E 7	13
458	7	E 8	3—4 Wochen
463	8	E 9	3—4 Wochen
E 3	$10^1/_2$		

Die Vitamin E-freie Kost nach DEMOLE setzt sich aus einem Gemisch von entfettetem Casein, Rohrzucker, Schweineschmalz, Trockenhefe und einem Salzgemenge zusammen. Außerdem erhielten die Tiere zusätzlich Carotin und Vitamin D_2.

[1] MARKEES hat neuerdings auf die Beziehungen des Vitamin E zum Muskelstoffwechsel aufmerksam gemacht. Unter Vitamin E-Mangel fand sich nach Grundumsatzbestimmung am ganzen Tier und nach Atmungsversuchen an isolierten Muskelzellen eine Steigerung des O_2-Verbrauchs. Durch Gaben von *dl*-α-Tocopherol konnte der Sauerstoffverbrauch bei E-avitaminotischen Ratten normalisiert und bei gesunden Tieren vorübergehend gesenkt werden. Die bei E-Avitaminose regelmäßig auftretende Kreatinurie schwindet bei Zulagen von Vitamin E.

[2] Für die Überlassung des Untersuchungsmaterials und für weitere Unterstützung sind wir der Wissenschaftlichen Abteilung der Firma F. Hoffmann-La Roche & Cie., Basel, zu großem Dank verpflichtet.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation. Die Organe wurden größtenteils in Formol fixiert, zum Teil auch in Carnoy und Susa-Gemisch. Abgesehen von einzelnen Gefrierschnitten wurde das Material in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden vor allem mit Eisenhämatoxylin-Eosin gefärbt, außerdem wurden Färbungen nach Masson, van Gieson, Feulgen und Feyrter neben Elasticafärbung, Berlinerblau- und Turnbullblau-Reaktion vorgenommen.

Untersuchungsbefunde.

Der *Uterus* der Vitamin-E-frei ernährten Ratten erscheint makroskopisch immer von normaler Größe. Mit der Dauer des Versuches zunehmend tritt eine gelbbraune Verfärbung auf. Diese Pigmentierung kann hie und da auch auf das Peritoneum der Nachbarschaft übergreifen.

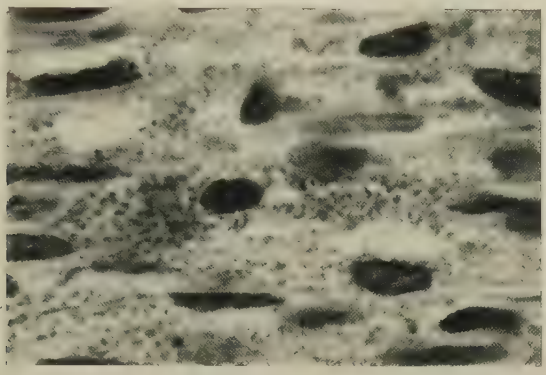


Abb. 1. Uterusmuskulatur im Längsschnitt. Dichte Ansammlungen von Pigmentschollen in den glatten Muskelfasern. Hyperchromatose und beginnende Pyknose einzelner Muskelkerne. 1:1000.

Die mikroskopische Untersuchung zeigt die Wandschichtung des Uterus im allgemeinen gut erhalten. In der Mucosa finden sich etwas unregelmäßig cystisch gestaltete Drüsenschläuche. Hie und da sind auch über das übliche Maß hinausgehend Ablagerungen von Hämosiderin zu erkennen. Epithel und Stroma zeigen sonst keine Besonderheiten. Die Bündel glatter Muskelfasern sind gut erhalten und auch die einzelnen Fasern leicht abgrenzbar. Sowohl in den quergetroffenen als auch in den längsgetroffenen Fasern sieht man dichte Ablagerungen von Pigmentschollen (Abb. 1). Der Pigmentgehalt der einzelnen Fasern und Muskelbezirke ist verschieden. Zu Beginn — nach etwa 4 Monaten Vitamin-E-freier Diät — liegen die körnig bis glasig-tropfigen Pigmentschollen in den erweiterten Sarkoplasmaräumen an den Polen der Kerne. Bei längerer Versuchsdauer füllt das Pigment die einzelnen Fasern bis zum Rand hin aus. Auffallend ist, daß dabei die einzelnen Fasern meist noch gut abgrenzbar bleiben, wie überhaupt Zerfallserscheinungen und Abräumprozesse erst in einem fortgeschrittenen Stadium zu finden sind. Bemerkenswert sind auch Kernveränderungen im Sinne von leichten Kernverdichtungen bis zur beginnenden Pyknose (vgl. Abb. 1). Andere

Muskelkerne zeigen auffallende Vergrößerungen mit lockerer, fast wabiger Chromatinstruktur. Im FEULGEN-Präparat weisen meist nur die pyknotischen Kerne eine Vermehrung der FEULGEN-positiven Substanz auf. Bei den Tieren mit längster Versuchsdauer kommt es schließlich doch zum Untergang größerer Muskelbezirke, so daß im VAN GIESON-Präparat fibröse Verödungsherde, die die ganze Uteruswand durchsetzen können, nachzuweisen sind. Zwischen den glatten Muskelfasern,

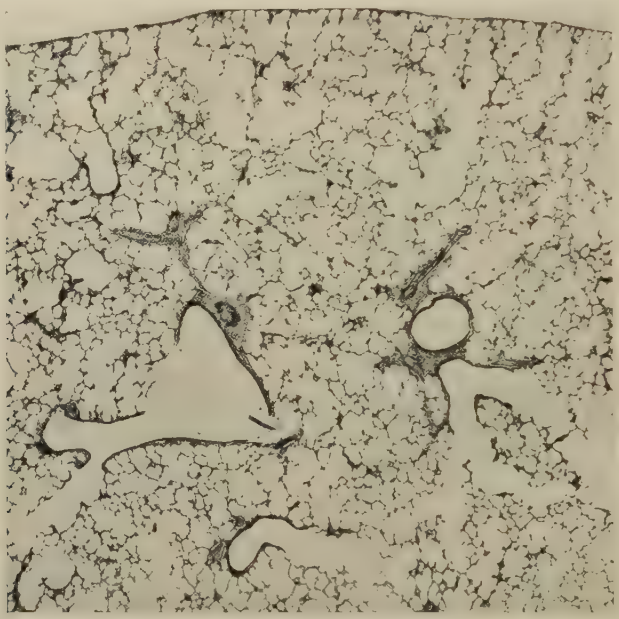


Abb. 2. Lunge mit stark erweiterten Bronchien, Bronchioli und Alveolargängen Umschriebenes Emphysem. 1:25.

besonders aber in der Umgebung von kleinen Venen und Arterien, sind regelmäßig kleinere oder dichtere Ansammlungen von pigmentbeladenen Makrophagen zu erkennen (vgl. Abb. 5). Das Pigment stimmt histologisch teilweise überein mit dem in den glatten Muskelfasern, teilweise zeigt es in den Makrophagen im Gegensatz zu dem in den Muskelfasern eine deutlich positive Berlinerblau-Reaktion, wobei Übergänge von einem grünen bis zu einem blauen Farbton vorkommen.

Die mikroskopische Untersuchung der *Lungen* ergibt, daß große Lungenbezirke nicht zusammengesunken, sondern gebläht sind. Die großen und kleinen Bronchien sind deutlich erweitert und ihre Wände im Verhältnis zur Lichtung abnorm dünn. Die in gewöhnlicher Weise fixierten Lungenteile zeigen nicht die charakteristische Faltenbildung der Bronchialschleimhaut. Die Erweiterungen der

Bronchien und Bronchioli setzen sich in die Alveolargänge fort, und stellenweise sind auch die Infundibula erweitert, die Alveolarsepten reduziert (Abb. 2). Diese Veränderungen sind nicht bei allen Tieren gleichmäßig entwickelt; bei Ratte E 5 sind sie am deutlichsten zu sehen, bei Ratte E 6 und E 7 aber auch sicher nachweisbar. Die Untersuchung mit starker Vergrößerung deckt bei diesen 3 Ratten mit längster Versuchsdauer in den glatten Muskelfasern der Bronchien und Bronchioli gleiche Pigmentschollen wie in der Uterusmuskulatur auf. Es kommt auch hier zum Untergang von Muskelfasern, so daß die

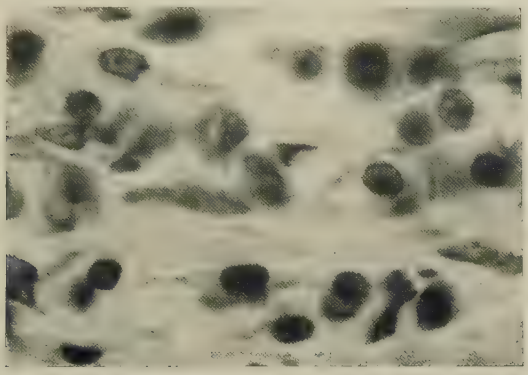


Abb. 3. Zerfallende pigmentbeladene glatte Muskelfasern und einzelne Makrophagen in der Bronchialwand. 1:1000.

muskuläre Wandschicht vollkommen zerstört ist (Abb. 3). Makrophagen übernehmen den Abtransport und die Verarbeitung der freiwerdenden Pigmentschollen. Bei der Elasticafärbung sieht man die Faserstrukturen noch gut erhalten, aber ganz entleert von Muskulatur. Stellenweise tritt eine fibröse Verödung der Bronchialwände ein. An den erweiterten Bronchien kommt es auch zu einer Umformung der stark gedehnten Epithelauskleidung, so daß schließlich nur noch ein dünner Belag aus kubischen Zellen erhalten bleibt (Abb. 4). An den Knorpelspangen der größeren Bronchien treten schließlich Abbauerscheinungen mit Entwicklung von Chondroklasten auf, die als dichte Säume den Knorpel umgeben (Abb. 4). Die Alveolen enthalten hie und da Nester von verfetteten Alveolarepithelien, die sich von einzelnen im Interstitium nachweisbaren pigmentführenden Zellen mit positiver Eisenreaktion leicht unterscheiden lassen. Auch die glatte Muskulatur der Trachea weist einen gleichen Befund von Pigment und Faseruntergängen auf.

Das *Gefäßsystem* zeigt in den verschiedenen Abschnitten unterschiedliche Befunde. An den Aorten haben wir keine eindeutigen Veränderungen nachweisen können. Die Wandschichtung ist regelrecht,

die glatten Muskelfasern der Media sind unverändert. An den Arterien der Extremitäten treten dagegen eindeutige Veränderungen auf. Zunächst finden sich ganz ungewöhnliche Ein- und Durchschnürungen der Kerne neben einzelnen Kernpyknosen. Pigmentschollen werden an den glatten Muskelfasern nur hie und da beobachtet. In der Adventitia sieht man in der Umgebung der Vasa vasorum pigmentbeladene Makrophagen. Im Vergleich mit den nur wenig veränderten Arterien sind die Muskelfasern der Venen sowohl der verschiedenen Organe als auch der Extremitäten fast immer betroffen. Auch hier kommt es zu einer gleichen Einlagerung von Pigmentschollen,

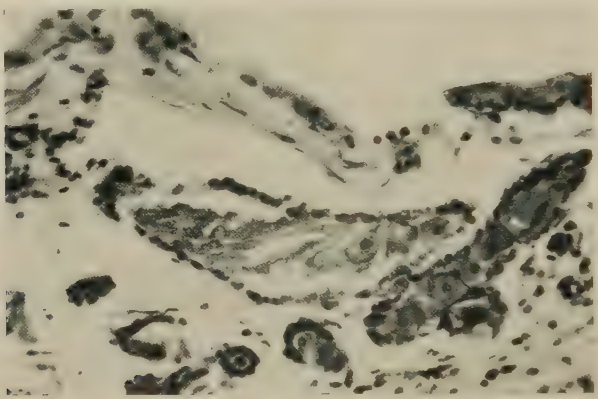


Abb. 4. Umwandlung des Epithels eines stark erweiterten Bronchus in kubisches Epithel. Beginnende Abbauvorgänge am Bronchialknorpel. 1:300.

die schließlich die einzelnen Fasern ganz ausfüllen (Abb. 5). Kernpyknosen und Faseruntergänge lassen sich selten sicherstellen.

Veränderungen der *Herzmuskulatur* werden bei sämtlichen Tieren, die länger als 6 Monate Vitamin-E-frei ernährt waren, gefunden. Die Schwere der Veränderungen nimmt offenbar mit der Versuchsdauer zu. Ähnlich wie in den glatten Muskelfasern kommt es auch hier zur Ablagerung des eigenartigen Pigments. Zwischen den Fibrillen sieht man feine Körner oder Tröpfchen, die oft perlschnurartig angeordnet sind; meist ist aber auch die Fibrillenstruktur zerstört, und ganze Konglomerate von Tropfen und Schollen füllen die Muskelfasern aus (Abb. 6). Das Pigment ist nicht unbedingt an die Nachbarschaft der Kerne gebunden, es ist eisennegativ und unterscheidet sich von allen bisher bekannten Pigmenten der Herzmuskulatur. Ebenso wie im Uterusmuskel kann das Pigment in den Herzmuskelfasern offenbar lange erhalten bleiben. Der Abbau und Abtransport erfolgt auch hier nur langsam durch Makrophagen mit Auftreten einer positiven Berlinerblau-Reaktion. Die schließlichen Faseruntergänge sind in der Herz-

muskulatur besonders gut zu erkennen. Abb. 7 zeigt eine Gruppe leerer Muskelschläuche mit mäßiger Fibroblastenwucherung der Umgebung und Resten von Muskelkernen. Durch Zusammenfließen solcher

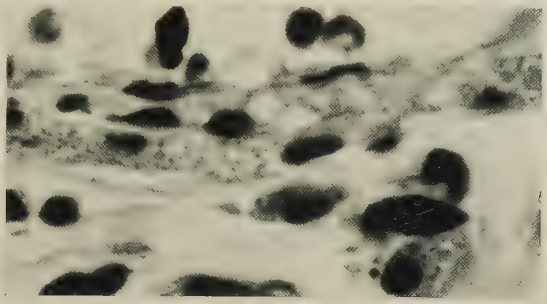


Abb. 5. Pigment in den glatten Muskelfasern einer Uterusvene. Daneben einzelne pigmentbeladene Makrophagen. 1:1000.

Muskelnekrosen kommt es schließlich zur Entwicklung junger Narben (Abb. 8). Zwischen den spindeligen Bindegewebszellen finden sich hier immer Muskelkerne in allen Stadien der Pyknose und Reste von noch

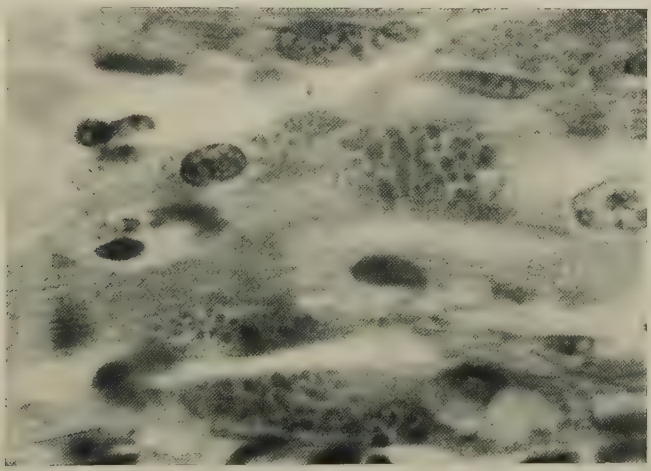


Abb. 6. Herzmuskelfasern mit tropfigen Pigmentschollen und Kerneinschnürungen bei Amitose. 1:900.

nicht abgebautem Pigment. Früheste Veränderungen lassen sich im Herzmuskel an den Muskelkernen nachweisen. Die Größe der Kerne schwankt außerordentlich, immer wieder kommen Riesenkerne vor. Dann sieht man beginnende Amitosen mit Kerneinschnürungen (vgl. Abb. 6). Außerdem kommt es zu vollendeten Querteilungen, so daß unter Umständen 4—5 Kerne perlschnurartig angeordnet sein können.

Seltener sind Längsdurchschnürungen mit semmelartiger Zusammenlagerung der Kerne. Diese mannigfachen Stadien der Amitose treten

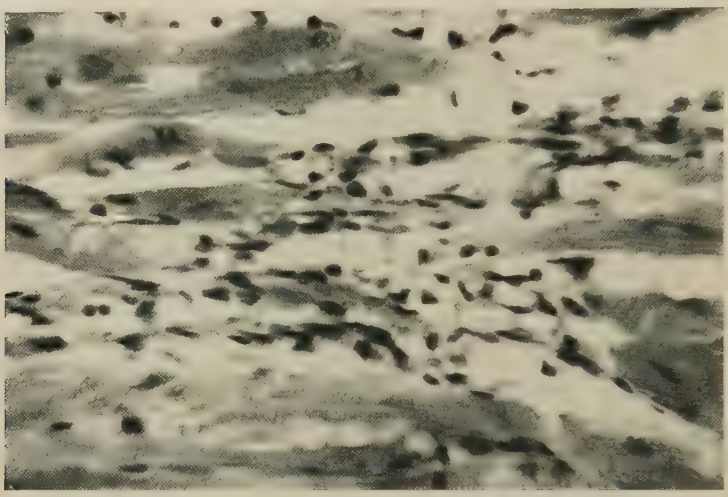


Abb. 7. Gruppe nekrotisch zerfallener Herzmuskelfasern mit mäßiger Zellreaktion. 1:450.

schon auf, wenn die Muskelfasern sonst noch unverändert sind. In FEULGEN-Präparaten zeigen die Tochterkerne immer kräftige Nukleoli,

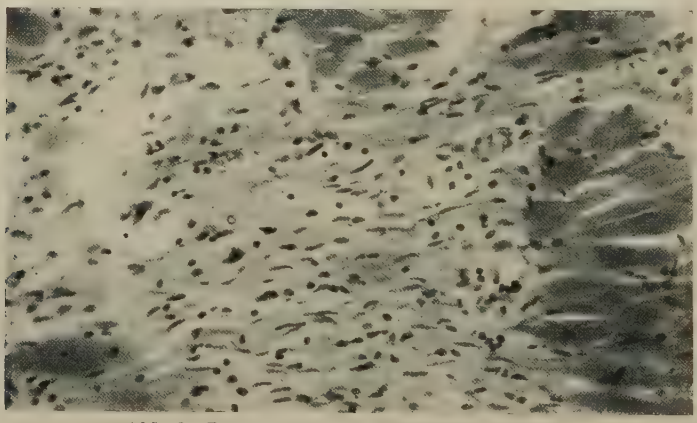


Abb. 8. Junge Narbe im Herzmuskel. 1:250.

deren Entwicklung wohl aus vorher rückgebildeten Nebennukleoli abzuleiten ist. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist auch die starke Vermehrung der sogenannten „basophil degenerierten" Herzmuskelfasern bemerkenswert. Abb. 9 zeigt diese zwischen unveränderte Faserbündel eingestreuten dunklen „basophil degenerierten" Muskel-

fasern. Die einzelnen Elemente sind manchmal aufgetrieben und vakuolisiert, meist aber verschmälert und kollabiert und enthalten kleine Schollen bei sonst noch gut erhaltener Fibrillenzeichnung. Die

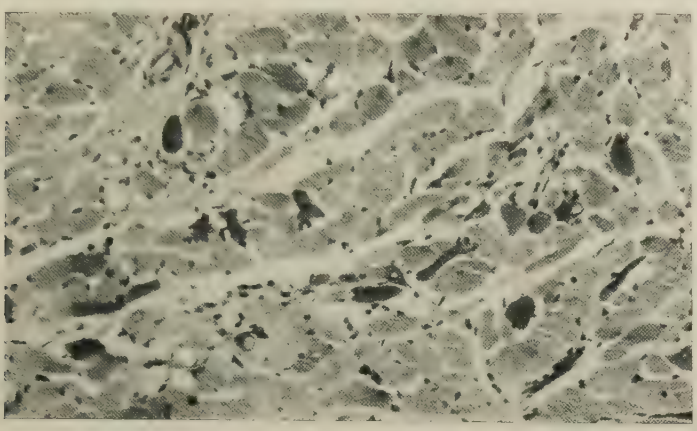


Abb. 9. Zahlreiche „basophil degenerierte" Fasern im Herzmuskel. 1:200.

Zellkerne sind verkleinert und oft hyperchromatisch mit Übergängen zu Kernpyknosen. Bei der FEULGEN-Reaktion ist in diesen Kernen aber nur eine geringe Vermehrung der FEULGEN-positiven Substanz festzustellen. Als weitere Besonderheit sieht man bei den Versuchstieren im Interstitium immer wieder sogenannte Myocyten (ANITSCHKOW). Die Zellen bestehen fast nur aus einem großen ovalen Kern mit raupenförmiger Verdichtung des Chromatins in der Kernmitte (Abb. 10). Solche Strukturen dürften höchstens ausnahmsweise aus Muskelkernen entstehen; meist handelt es sich um histiocytäre Elemente. Die dichten Chromatinmassen sind immer FEULGEN-positiv. Bei der Durchsicht der Präparate haben wir den bestimmten Eindruck gewonnen, daß die Entwicklung der eigenartigen Kernform auf chromatindichte Bindegewebskerne zurückgeht, deren Kernwand durch Flüssigkeitsaufnahme abgehoben wird, so daß die dunklen raupenförmigen Chromatinmassen jetzt in einer hellen Kernblase liegen. Wir können also nicht von einer Chromatinvermehrung oder Chromatinverdichtung sprechen.

Abb. 10. Myocyten mit raupenförmigem Chromatin. 1:2000.

Die *Skelettmuskulatur* zeigt bei allen Tieren schwere Veränderungen. Die verschiedenen Muskelgruppen der hinteren und vorderen Extremitäten sind bevorzugt beteiligt, aber auch in der Halsmuskulatur,

im Musculus masseter und in der Zungenmuskulatur sind gleiche Befunde zu erheben. In der Zungenmuskulatur ist noch besonders bemerkenswert, daß ganze Bündel von Fasern „basophil degeneriert" sind. In der übrigen Sklelettmuskulatur finden sich nur einzelne Fasern mit „basophiler Degeneration". Die Hauptveränderungen der Skelettmuskulatur bestehen aber in einer wachsartigen Degeneration und in scholligem Zerfall einzelner Fasern und ganzer Muskelbündel. Grundsätzlich lassen sich zwei Formen unterscheiden, einmal die einfachen Zerfallserscheinungen mit Schollenbildung und Vermehrung pyknotischer Kerne sowie Einwanderung einzelner Leukozyten (Abb. 11),

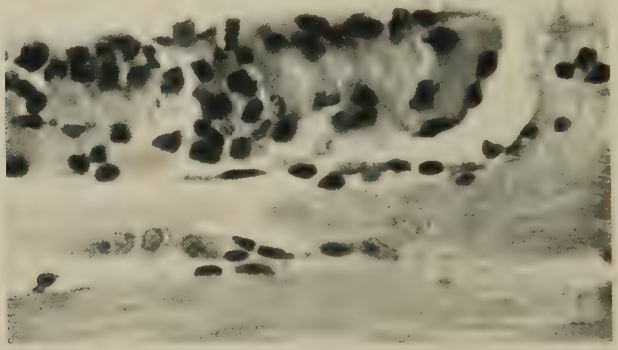


Abb. 11. Nekrose einer Skelettmuskelfaser. Zahlreiche pyknotische Kerne. Einzelne Leukozyten und histiozytäre Elemente. 1:600.

ein Befund, der mit den Faseruntergängen übereinstimmt, wie sie bei Tier und Mensch aus anderer Ursache als Vitamin-E-Mangel bekannt sind. Dann finden sich eigenartige Zerfallserscheinungen in anderen Fasern, die feine tropfige oder schollige Pigmenteinlagerungen aufweisen. Dieses Pigment liegt zwischen den Muskelfibrillen — wenigstens zunächst —, später kommt es zu gröberen Zerstörungen auch der Fibrillen. Die Veränderungen können ihren Anfang von den Randgebieten der Muskelfasern her nehmen (Abb. 12) oder aber in der Nachbarschaft der Muskelkerne beginnen. Kernveränderungen sind regelmäßig zu sehen (Abb. 13). Neben amitotischen Kerndurchschnürungen finden sich bizarre Verunstaltungen der Kerne, die unter Umständen Kernvakuolen vortäuschen (Abb. 13). Schließlich kommt es zu Kernhyperchromatosen und Kernpyknosen. Ähnlich wie im Herzmuskel sind Veränderungen der Muskelkerne schon zu finden, wenn die Faserstruktur noch gut erhalten ist. Auch hier sind reichlich Amitosen zu erkennen, vereinzelt auch ganze Trauben von Muskelkernen mit deutlich sichtbaren Nukleoli (Abb. 14). Die Bilder der sogenannten Wucheratrophie können in geradezu klassischer

Weise entwickelt sein. Auch in der Skelettmuskulatur ist zu bemerken, daß selbst bei erheblichen Faseruntergängen die Abbau- und Abtransportleistungen relativ gering sind. Gelapptkernige Leukozyten sind

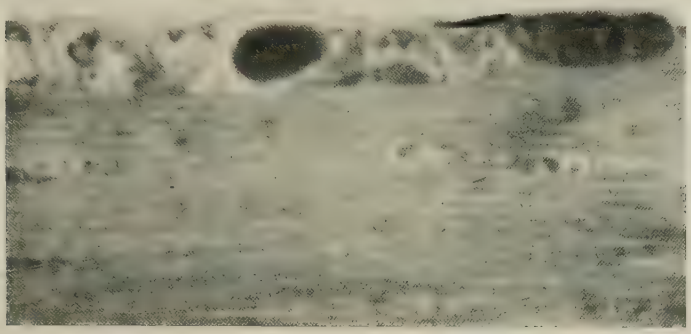


Abb. 12. Randständige Auflösung der Struktur einer Skelettmuskelfaser mit Ansammlung von feinem bis großtropfigem Pigment. 1:1500.

dabei nur selten beteiligt, und nur hie und da finden sich in der Umgebung kleinerer Gefäße Gruppen von Makrophagen, die eisen-positives Pigment führen.

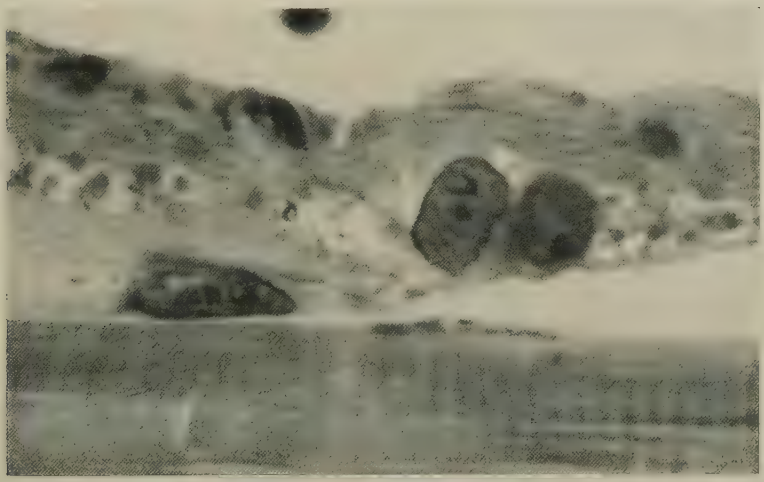


Abb. 13. In Auflösung begriffene Skelettmuskelfaser mit Kernveränderungen und Pigmentschollen. 1:1500.

Die *Nieren* zeigen meist eine gut erhaltene Struktur. An den Glomeruli und an den arteriellen Gefäßen wird kein besonderer Befund erhoben. Die glatten Muskelfasern von einzelnen Venen sind dagegen mit Pigmentschollen beladen. Die Hauptveränderungen finden sich an den Kanälchen. In großen Bezirken sind die Epithelien der

Tubuli contorti wabig umgewandelt und zum Teil auch mit Pigmentbröckeln, die eine positive Eisenreaktion geben, beladen. Schließlich kommt es in großen Bezirken zu einer nekrotisierenden Nephrose mit Ablösung des Epithels von der Basalmembran. Die Kanälchen enthalten reichlich wolkig-wabige und hyaline Zylinder, die die Lichtung fast vollkommen ausfüllen können. Neben solchen veränderten Nierenbezirken sind aber immer auch in der gleichen Niere noch solche zu finden, die fast jeden Befund vermissen lassen. Rundzelleninfiltrate aus lymphozytenähnlichen Elementen finden sich in den Nieren einzelner Versuchs- und Kontrolltiere.

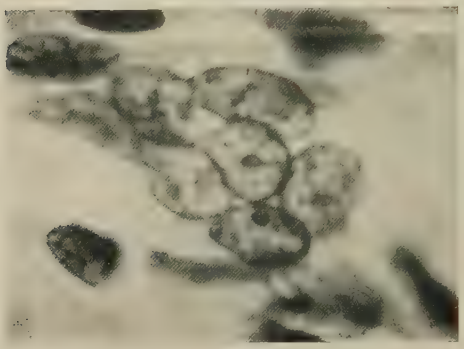


Abb. 14. Traubenförmige Kernwucherung bei sogenannter Wucheratrophie der Skelettmuskulatur. 1:1500.

In der *Leber* ist der Läppchenbau gut erhalten, auch die einzelnen Leberzellen sind so gut wie unverändert. Nirgends sind Leberzellnekrosen zu finden, und nur hie und da sind einzelne oder kleine Gruppen von sogenannten dunklen Leberzellen nachzuweisen. Ein Teil der Leberzellen enthält mittelgroße Fett-Tropfen. Die Kerne besitzen durchweg auffallend große Nukleoli. Die KUPFFERschen Sternzellen sind hin und wieder mit Pigment beladen, das immer eine positive Eisenreaktion gibt, während die Leberzellen pigmentfrei sind.

Die *Milz* zeigt mikroskopisch eine im allgemeinen gut erhaltene Struktur. Bei der Berlinerblau-Reaktion fällt im Vergleich zu den Kontrollen eine mäßige Vermehrung des Hämosideringehaltes auf. In den Milztrabekeln zeigen die Muskelfasern — ebenso in der Milzkapsel — gleiche Befunde, wie sie für die glatte Muskulatur des Uterus beschrieben wurden. Das Serosaepithel ist stellenweise fast kubisch. Diese Zellen enthalten ebenfalls Pigment, das teilweise eine geringe Blaufärbung bei der Berlinerblau-Reaktion annimmt.

Von den *endokrinen Drüsen* wurde die Schilddrüse so gut wie unverändert gefunden. Das Epithel ist flach bis kubisch, die Follikel sind gleichmäßig mit Kolloid gefüllt. — An den Nebennieren ist die Struktur von Rinde und Mark gut erhalten, hie und da finden sich einzelne pigmentbeladene Uferzellen der Capillaren. — Die Ovarien zeigen neben ruhenden Follikeln immer auch reifende Follikel und einzelne Corpora lutea. Im Stroma finden sich ganze Nester von Zellen, die meist mit einem eisenpositiven Pigment beladen sind. — An der Hypophyse sind nur geringe Veränderungen festzustellen. Die Basophilen zeigen hie und da eine wabige Auflösung des Protoplasmas, auch scheinen die Eosinophilen an Zahl relativ vermehrt. — Epiphyse und LANGERHANSsche Inseln wurden nicht untersucht.

Erörterung der Befunde.

Die Untersuchung der verschiedenen Körperorgane Vitamin-E-frei ernährter weiblicher Ratten ergibt nach der Versuchsdauer graduell

abgestufte, aber grundsätzlich gleiche Veränderungen, so daß eine gemeinsame Erörterung möglich ist. Den wichtigsten Befund sehen wir in der systemartigen Schädigung der verschiedenen muskulären Elemente.

Die glatten Muskelfasern des Uterus wie auch die der Bronchien, der Trachea, der Milz zeigen Einlagerungen eines eigenartigen Pigmentkörpers und außerdem Kernveränderungen und Faseruntergänge. Ähnliche Befunde sind auch an der glatten Muskulatur der Harn- und Geschlechtsorgane und des Magen-Darmkanals (Hessler, Mason und Emmel) beschrieben, so daß die Ausbreitung der Veränderungen der glatten Muskelfasern gut zu überblicken ist. Eine gewisse Ausnahmestellung kommt höchstens den muskulären Elementen der Aorten und Arterien zu, die nicht oder nur wenig beteiligt sind. Die Venen zeigen dagegen — wenigstens bei längerer Versuchsdauer — gleiche Befunde wie die Uterusmuskulatur.

Auch die Herzmuskulatur ist bei einer Versuchsdauer von mehr als 6 Monaten regelmäßig verändert. Mason und Emmel erhoben Befunde am Herzen erst nach 10 monatiger Versuchsdauer. Genau wie in den glatten Muskelfasern wird auch hier das eigenartige Pigment gefunden, daneben treten Kernveränderungen und Amitosen hervor. Schließlich kommt es zu Faseruntergängen und Narbenbildung. Die Vermehrung basophiler Fasern dürfte ebenso wie das Auftreten von sog. Myocyten eine unspezifische Folge des Vitamin-E-Mangels sein.

Die Veränderungen der Skelettmuskulatur, die schon lange bekannt sind, erfassen nicht nur die Extremitäten, sondern auch die Kaumuskulatur, die Zunge und der Ösophagus werden davon betroffen. Besonders charakteristisch für den Vitamin-E-Mangel dürften auch hier die Faseruntergänge sein, die mit dem Auftreten des Pigments verbunden sind. Die Kernveränderungen und einfachen Faseruntergänge müssen aber auch immer wieder berücksichtigt werden.

Der systemartige Charakter der Veränderungen der verschiedenen muskulären Elemente wird noch eindrucksvoller, wenn man die geringen Veränderungen der epithelialen Organe zum Vergleich heranzieht. Die Leber ist bei allen Tieren so gut wie normal. Die Schädigungen der Niere sind seit Martin und Moore bekannt und dürften kaum primär durch den Vitamin-E-Mangel bedingt sein, sondern durch die Ausscheidung von Muskelzerfallsprodukten. Die Untersuchung der endokrinen Drüsen ergibt lediglich für die Hypophyse geringe Veränderungen, so daß wir im allgemeinen der eingangs erwähnten Auffassung von Drummond, Noble und Wright zustimmen können.

Die formale Genese der Veränderungen an den muskulären Elementen bei Vitamin-E-Mangel möchten wir nach dem Vergleich der Befunde an glatten Muskelfasern, an der Herz- und Skelettmuskulatur

so beurteilen, daß die ersten Erscheinungen wohl in Kernveränderungen bestehen. In den Frühstadien des Vitamin-E-Mangels oder aber auch als Ausdruck eines milderen Schadens kommt es zu Reaktionen an den Muskelkernen. Die Kerne werden größer, vereinzelt finden sich sogar Riesenkerne. Es kommt weiter zu Kerneinschnürungen, so daß insbesondere die Herzmuskulatur ein dankbares Objekt für das Studium von Amitosen ist. In der Skelettmuskulatur kann unter dem Bild der Wucheratrophie die Kernvermehrung ganz im Vordergrund stehen. An den glatten Muskelfasern sind entsprechende Veränderungen nur selten nachzuweisen, immerhin fällt auch hier die Variabilität der Kerngröße auf. Die Stadien der Kernhyperchromatosen und Kernpyknosen sind bei allen muskulären Elementen zu finden. Die oft dabei eintretenden Verunstaltungen der Kerne sind in der Skelettmuskulatur am besten zu erkennen. Als weitere charakteristische Störung kommt es bei Vitamin-E-Mangel zu Ablagerungen von Pigment, das meist zunächst in Kernnähe gefunden wird. Der Pigmentcharakter ist bei glatter Muskulatur, Herz- und Skelettmuskulatur nach allen von uns angewandten histologischen und histochemischen Untersuchungsmethoden der gleiche. Wir stimmen mit allen früheren Untersuchern darin überein, daß die Natur dieses Pigmentkörpers sich von der aller bisher bekannten Pigmentkörper unterscheidet. Die in der kontraktilen Substanz eingelagerten Pigmenttropfen und -schollen können lange reaktionslos liegenbleiben, wobei auch die übrige Faserstruktur auffallend gut erhalten sein kann. Nach Faseruntergängen wird das Pigment von Makrophagen aufgenommen und verarbeitet, so daß es jetzt eisenpositiv ist. Eine Verschleppung des Pigments auf dem Lymph- und Blutwege kann nach den Befunden an Leber und Milz angenommen werden, aber auch intraperitoneal dürfte das Pigment vom Uterus her verschleppt werden können. Wir möchten vermuten, daß das Pigment aus Myoglobinbestandteilen zusammengesetzt ist, ohne daß sich dies färberisch bisher weiter sichern ließ. Es wäre zu wünschen, daß durch weitere chemische Untersuchungen des extrahierbaren Stoffes oder auch durch elektronen-mikroskopische Untersuchungen die Natur dieses vielleicht bedeutsamen pathologischen Produktes des muskulären Stoffwechsels geklärt würde. Der höchste Grad der Vitamin-E-Mangelschädigung führt schließlich zu Faseruntergängen, die wiederum an der Herz- und Skelettmuskulatur leichter zu erkennen sind als an den glatten Muskelfasern.

Aus diesen muskulären Schäden ergeben sich weitere Folgeerscheinungen für die verschiedenen Organe. An der Uterusmuskulatur führt die fibröse Verödung schließlich zu einer wesentlich wohl mechanisch bedingten Sterilität. Diese Auffassung wurde auch von DE FARIA vertreten. Der Ausfall der muskulären Elemente der Lunge führt zu

einer Erweiterung der zuführenden Atemwege im Sinne von Bronchiektasen. Folgeerscheinungen der Veränderungen am Gefäßsystem sind bisher nicht bekannt. Vielleicht dürfte in diesem Zusammenhang die von Telford, Swegart und Schoene beschriebene Senkung des Blutdrucks bei Vitamin-E-Mangel von Bedeutung sein. Die Befunde am Herzmuskel könnten eine Erklärung für die von Ensor nachgewiesenen, allerdings geringfügigen elektrokardiographischen Veränderungen bei Vitamin-E-Mangel-Ratten abgeben. Die Ausfälle der Skelettmuskulatur sind zweifellos Hauptursache für die bekannten motorischen Störungen der Tiere nach Vitamin-E-freier Ernährung.

Die erhobenen histologischen Befunde, insbesondere die systemartige Schädigung aller muskulären Elemente, ergeben wichtige Hinweise für die Pathogenese. Es erscheint uns schwer vorstellbar, daß die Schädigung der muskulären Elemente im Sinne der Ausführungen von Einarson und Ringsted jeweils von einer vorgeschalteten Nervenzell- oder Nervenfaserschädigung abhängig sein soll. Einarson und Ringsted hatten diese Hypothese vor allem für die Befunde an der Skelettmuskulatur aufgestellt. Die Durchgängigkeit der Veränderungen der muskulären Elemente macht es viel wahrscheinlicher, daß entsprechend den eingangs zitierten neueren biochemischen Untersuchungen eine primäre Muskelstoffwechselstörung vorliegt. Diese betrifft sowohl die glatten Muskelfasern, wo auch immer sie vorkommen, als auch die Herz- und Skelettmuskulatur. Mit dieser Feststellung sollen die auch von uns gesehenen Veränderungen am zentralen und peripheren Nervensystem in ihrer Bedeutung nicht herabgesetzt werden; es wird aber noch abzuschätzen sein, inwieweit sie sekundärer Natur sind oder aber gleichzeitig mit den Muskelveränderungen auftreten.

In vergleichend-anatomischer Betrachtung ist hervorzuheben, daß die muskulären Veränderungen bei Ratten offenbar erst nach langer Versuchsdauer auftreten, während andere Tierarten (Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde, Affen usw.) empfindlicher zu sein scheinen. Nach Swahn, Obel und Wanntrop ist die mit schweren Muskelveränderungen einhergehende, spontane „Stiff-Lamb-Disease" auf Vitamin-E-Mangel zurückzuführen.

Zusammenfassung.

1. Es wird über Organveränderungen bei chronisch Vitamin-E-frei ernährten Ratten berichtet.

2. Vitamin-E-Mangel führt zu einer systemartigen Schädigung aller muskulären Elemente sowohl der glatten Muskelfasern als auch der Herz- und Skelettmuskulatur.

3. Die muskulären Elemente zeigen histologisch zunächst Kernveränderungen, dann Ablagerungen eines eigenartigen Pigments, und schließlich kommt es zu Faseruntergängen und zu mehr oder minder stark ausgebildeten Narben.

4. In den Lungen führt der Schwund der glatten Muskelfasern bei einzelnen Tieren zu bronchiektatischen Veränderungen.

5. Die formale und die kausale Genese der Veränderungen werden kurz erörtert. Auf Grund der systemartigen Schädigung aller muskulären Elemente wird die Bedeutung einer primären Muskelstoffwechselstörung bei Vitamin-E-Mangel in den Vordergrund gestellt.

Literatur.

Zusammenfassende Arbeiten.

BICKNELL, F. and F. PRESCOTT: The vitamins in medicine. London 1946. — EINARSON, L. and A. RINGSTED: Effect of chronic vitamin E deficiency on the nervous system and the skeletal musculature in adult rats. Copenhagen-London 1938. — JOHN, W.: Physiologie und Chemie der Vitamin E-Faktoren. Erg. Physiol. **42**, 2 (1939). — MASON, K. E.: Vitamins and Hormons. New York 1944. — STEPP, KÜHNAU u. SCHRÖDER: Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Stuttgart 1944. — Society of Chemical Industry. Vitamin E. A Symposium. London 1939.

Einzelarbeiten.

AMES, S. R.: J. biol. Chem. (Am.) **169**, 503 (1947). — ANITSCHKOW: Beitr. path. Anat. **55**, 373 (1913). — ATHANASSIU, G.: Med. Mschr. **1948**, 186. — BARRIE. M. M. O.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 1467, 1474, 2134 (1938). — BOMSKOV, C. u. E. SCHNEIDER: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 715 (1939). — BORMANN, P. u. H. A. HEINSEN: Dtsch. Arch. klin. Med. **193** 157 (1948). — CHOR, H. and R. E. DOLKART: Arch. Path. (Am.) **27**, 497 (1939). — DEMOLE, V.: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 1251. — DEMOLE, V. u. P. KNAPP: Ophthalmologica (Schweiz) **101**, 65 (1941). — DEMOLE, V. et H. PFALTZ: Rev. méd. Suisse rom. **60**, 464 (1940). — DEMOLE, V. u. F. VERZÁR: Verh. Schweiz. Physiol. Tagung, Bern 1939. — DRUMMOND, J. C., R. L. NOBLE and M. D. WRIGHT: J. Endocrinol. **1**, 275 (1939). — EMERSON, G. A. and H. M. EVANS: J. Nutrit. (Am.) **18**, 501 (1939). — ENSOR, C. R.: Amer. J. physiol. **147**, 477 (1946). — ESCUDERO, HERRAIZ u. POLAK: Trabajos Cientificos del Instituto Nacional de la Nutricion, p. 35. 1940/41. — EVANS, H. M. and K. S. BISHOP: Science (N. Y.) **56**, 650 (1922). — EVANS, H. M. and G. O. BURR: J. biol. chem. (Am.) **76**, 273 (1928). — EVANS, H. M., EMERSON and EMERSON: J. biol. chem. (Am.) **113**, 319 (1936). — EVANS, H. M., G. A, EMERSON and I. R. TELFORD: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **38**, 623 (1938). — DE FARIA: J. amer. med. Assoc. **131**, 626 (1946). — FREIRE: Brasil-Med. **55**, 308 (1941). — FRIEDMANN, I. and H. J. MATTILL: Amer. J. Physiol. **131**, 595 (1940/41). — GATZ, A. J. and O. B. HOUCHIN: Anat. Rec. (Am.) **99**, 578 (1947). — GIEDOZS, C. R.: Soc. Biol. **129**, 342 (1938). — GOETTSCH and PAPPENHEIMER: J. exper. Med. **53**, 11 (1931). — GOVIER, M. W. and N. S. JETTER: Science (N. Y.) **107**, 146 (1948). — GRANADOS, H., K. E. MASON and H. DAM: Acta path. et micro-biol. scand. (Dän.) **24**, 86 (1947). — DE GUTIERREZ-MAHONEY, MASON and SWANSON: Amer. J. Physiol. **133**, 308 (1941). — HESSLER, W.: Z. Vitaminforsch. **11**, 9 (1941). — HARRIS, P. L.: Arch. Biochem. (Am.) **8**, 395

(1945). — Houchin, O. B.: J. biol. Chem. (Am.) **146**, 313 (1942). — Hummel, J. P. and D. H. Basinski: J. biol. Chem. (Am.) **172**, 417 (1948). — Hüter, F.: Z. Naturforsch. **2**, 414 (1947). — Ingelmann-Sundberg, A.: Acta physiol. scand. (Schwd.) **16**, 250 (1948). — Karrer, P. u. V. Demole: Schweiz. med. Wschr. **1938**, 954. — Karrer, P. u. H. Keller: Helvet. chim. Acta **21**, 1161 (1938). Kaunitz, H. and J. J. Beaver: J. biol. Chem. (Am.) **166**, 205 (1946). — Kaunitz, H. and A. M. Pappenheimer: Amer. J. Physiol. **138**, 328 (1943). — Mackenzie, C. G.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **49**, 313 (1942). — Markees, S.: Helvet. med. Acta **15**, 528 (1948). — Martin, A. J. P. and T. Moore: Chem. a. Industry **55**, 236 (1936); **57**, 973 (1938). — J. Hyg. (Brit.) **39**, 643 (1939). — Mason, K. E.: Amer. J. Anat. **52**, 153 (1933). — Mason, K. E. and A. F. Emmel: Anat. Rec. **92**, 33 (1945). — Mason, K. E. and I. R. Telford: Arch. Path. (Am.) **43**, 463 (1947). — Meessen, H.: Verh. int. Kongr. Karlsruhe, Bad Wörishofen 1948. — Ärztl. Forsch. **2**, 98 (1948). — Menschik, Z.: Quart. J. exper. Physiol. **34**, 97 (1948). — Monnier, M.: Z. Vitaminforsch. **11**, 235 (1941). — Nelson, W. O.: Anat. Rec. **56**, 241 (1933). — Olcott, H. S.: J. Nutrit (Am.) **15**, 221 (1938). — Swahn, O., A. L. Obel u. H. Wanntrop: Skand. Vet. Tidskr. **38**, 129 (1948). — Sweeten and M. M. Barrie: Biochem. J. (Brit.) **37**, 523 (1943). — Telford, I. R., J. E. Swegert and F. C. Schoene: Amer. J. Physiol. **143**, 214 (1945). — Verzár, F.: Z. Vitaminforsch. **9**, 242 (1939).

Aus dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der früheren Universität Breslau (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler).

Über den Abbau der p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Ratten und seine Verwendung als Leberteste.

Von

O. Eichler und M. Hahn.

(Eingegangen am 11. Oktober 1948.)

Die hier mitgeteilten Versuche mit der Methode von Felix und Teske[1] wurden rückwirkend nach längeren praktischen Versuchen angestellt, da sich bei unseren toxikologischen Experimenten Unregelmäßigkeiten systematischer Art herausgestellt haben. In früheren Versuchen mit Hindemith[2] an Katzen ergaben sich brauchbare Vergleiche, während an Ratten nicht einmal sicher erschien, ob die Millonsche Probe nach Leberschädigung und Belastung stärker oder schwächer wurde. Unsere Versuche wurden an einem großen Material vorgenommen, z. B. für diese erste Serie an rund 150 Tieren, bei denen bis zu 5 einzelne Funktionsprüfungen erfolgten, so daß bei 4—5 Analysen je Funktionsprüfung schließlich allein zu diesen Untersuchungen etwa 2000 Analysen notwendig waren. Außerdem wurde jede Leber histologisch kontrolliert und versucht, eine Beziehung zwischen Leberfunktion und histologischem Bild zu finden. Unsere Darstellung hält sich nicht an den historischen Verlauf der Versuche, weil wir ursprünglich dachten, die Methode einfach übernehmen zu können. So blieben uns vielerlei Irrwege nicht erspart.

Methodik.

Die Bestimmung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure erfolgte nach der Methode von Felix und Teske[1]. Jedoch haben wir sofort die von Felix[3] kürzlich mitgeteilte Vereinfachung vorgenommen, auf die gesonderten Ätherextrakte zu verzichten, weil dieser Extrakt in der Originalmethode[1] zwar regelmäßig ausgeführt, aber in der Auswertung nie berücksichtigt wurde. Sehr wichtig ist die Wahl der zugeführten Menge von p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Wir wählten bei den meisten Versuchen 40 mg, später zeigte sich die kleinere Menge von 30 mg für schwache Schädigungen als vorteilhafter. Die Bestimmung erfolgte im lichtelektrischen Kolorimeter nach Havemann mit dem Filter BG 7.

[1] Felix, K. u. R. Teske: Hoppe-Seylers Z. **267**, 173 (1940). — [2] Hindemith, H. u. O. Eichler: Nichtveröffentlichte Versuche im Heubnerschen Arbeitskreis. — [3] Felix, K.: Hoppe-Seylers Z. **281**, 36 (1944).

1. Einwirkung der Temperatur.

Die ersten Versuchsserien von je 15 Tieren wurden im Sommer 1943 angestellt. Dabei erwiesen sich die durchschnittlichen Normalwerte, d. h. vor der Leberschädigung soweit verschieden, daß die Differenz fast das Dreifache ihrer Streuung betrug. Da jener Sommer sich durch besonders große Temperaturschwankungen auszeichnete, suchten wir zuerst in dieser Richtung eine Abhängigkeit. Eine stärkere Fähigkeit zur chemischen Wärmeregulation ist gerade bei der Ratte nach den bekannten Versuchen von Freund und Isenschmidt zu finden und zum wesentlichen Teile in der Leber lokalisiert. Die zuerst erwähnten Versuche waren bei einer durchschnittlichen Tagestemperatur von 22,6 und 20° vorgenommen worden. Die Ausscheidungen betrugen 14,8% bei der höheren, 18,5% bei der niederen Temperatur. Bei einer weiteren Gruppe fanden sich bei 22° 14,1% wieder, während eine letzte Gruppe aus diesem System herausfiel, allerdings auch in der vorliegenden Normalausscheidung, die besonders unregelmäßig war. Der allgemeine Verlauf widerspricht einer ersten primitiven Erwartung.

Da der Stoffwechsel, gemessen am Sauerstoffverbrauch, bei höherer Temperatur geringer wird, ebenso die Eiweißausscheidung, wird man schließen, daß der Stoffwechsel allgemein bei höherer Temperatur geringer werden würde, also auch der Umsatz der p-Oxyphenylbrenztraubensäure.

Die Millon-Werte ohne Belastung zeigen keine Abhängigkeit von der Temperatur, schwanken überhaupt wenig, wie folgende Zusammenstellung zeigt (auf p-Oxyphenylbrenztraubensäure berechnet).

Tabelle 1.

Gruppe	Jahreszeit	Zahl der Tiere	Durchschnitt mg/Tag	Streuung des Kollektivs		Streuung des Mittelwertes	
					%		%
I	Juli-September 1943	45	3,4	0,95	27	0,14	4,1
II	Januar-Februar 1944	30	3,5	0,81	23	0,15	4,3
III	Mai-Juni 1944	53	3,6	0,62	17	0,086	2,4

Diese Beobachtung gilt auch für die folgende Versuchsserie, die mit der Absicht unternommen wurde, Verschiedenheiten bei wechselnder Temperatur aufzufinden.

Die Käfige wurden teils unter Kontrolle eines Maximumthermometers durch Lampen erwärmt, teils durch Wasserberieselung gekühlt. Über die Art der Zufuhr von p-Oxyphenylbrenztraubensäure wird unten berichtet. 2 Serien wurden in Angriff genommen. Bei einer Serie A von je 4 Tieren wurden Einzelwerte gewonnen. Bei einer zweiten Serie B (je 5 Tiere) wurden die Urine insgesamt verarbeitet, dann aber nach einiger Zeit die Gruppen gewechselt und die vorher

unter hoher Temperatur befindlichen unter niedere gesetzt und umgekehrt. Die Resultate geben wir in folgender Tabelle.

Tabelle 2.

Serie	Behandlung der Tiere	Ausscheidung %
A	22–23°	15,7
	27–29°	12,7
B Gruppe a	30–31°	1,3
„ b	20–21°	8,7
„ a	21–22°	5,3
„ b	30–31°	4,0

Während die erste Serie keinen signifikanten Unterschied ergeben würde, ist das bei der zweiten offenbar. Die Menge von 8,7% entspricht völlig dem an über 100 Tieren gewonnenen Durchschnitt, während 1,3% bei der hohen Temperatur für 5 Tiere unwahrscheinlich ist. Sämtliche Werte liegen in der vorher erwarteten Richtung und in dieser Hinsicht kann man jetzt auch den Versuch B schließlich verwerten und erhält eine Erklärung für die anfangs im Text mitgeteilten Befunde.

2. Thyroxin.

Um die Einwirkung des Stoffwechsels noch von anderer Seite zu prüfen, wurde eine Thyroxinbehandlung vorgenommen. 7 Ratten wurden zuerst einer Belastung ausgesetzt, dann an 2 Tagen hintereinander mit je 2 mg/kg Thyroxin (subkutan) behandelt, worauf am übernächsten Tage eine erneute Funktionsprüfung folgte. Die Resultate führen wir bei den 7 Ratten einzeln an. Die Temperaturen blieben konstant.

Tabelle 3.

Nr.	Ausscheidung	
	vorher %	nachher %
122	3,2	17,2
123	4,7	10,0
124	8,0	15,2
125	3,2	17,7
126	9,7	13,7
127	11,7	17,7
128	8,0	10,2
Durchschnitte:	$6,9 \pm 1,0$	$13,5 \pm 1,2$

Die Unterschiede sind auch ohne Berücksichtigung der Einzelwerte signifikant, die Differenz ist mehr als das 4fache der Streuungen.

Dieser Befund könnte in Parallele gesetzt werden zu der von Felix[3] beobachteten vermehrten Ausscheidung bei Basedowkranken, die Felix als Zeichen einer Leberschädigung bei Basedow — vielleicht mit Recht — auffaßt. Es ist aber die Frage, ob unsere 2malige Injektion von Thyroxin schon ausreicht, solche Effekte zu veranlassen. Hier paßt die Beobachtung ebenso in die vermehrte Ausscheidung bei höherem Stoffwechsel, verursacht durch Temperaturerniedrigung, wenn man nicht wiederum rückschließend annehmen will, daß überhaupt der Aufenthalt in höherer Temperatur zu besonderer Leberbelastung führt (wofür man vielleicht manche Beobachtungen aus den Tropen anführen könnte).

Aber abgesehen von diesen Urteilen über gut und böse ersehen wir aus den Befunden, daß eine Erhöhung des Stoffwechsels offenbar in bestimmten Bahnen verläuft und nicht allgemein alle Funktionen wahllos betrifft. Nach einem heutigen, wohl von KREBS herrührenden Brauch ist bei Fermentsystemen das Prinzip der Kompetenz methodisch und auch zur Auslegung üblich. Nach diesem würde man schließen, daß die Erhöhung des Stoffwechsels primär in einer Anlieferung von „Brennstoff" an die in Frage kommenden Fermente beruht. Damit werden sie in Anspruch genommen und haben nur eine kleinere Kapazität, zusätzlichen Belastungen gerecht zu werden. Die hier vorgetragene Auffassung würde einer Vermutung von HAFFNER über die Thyroxinwirkung entsprechen, die auch von uns gewisse Stützen gefunden hatte[4, 5]. Danach sollte Thyroxin primär an der anaeroben Phase des Kohlehydratabbaus angreifen. Ohne in eine Diskusion darüber einzutreten (die Unzulänglichkeit dieser Vermutung wurde schon vielfach erwiesen) wollen wir doch darauf hinweisen, daß der hier geprüfte Stoffwechselprozeß nach den Untersuchungen von FELIX abseits des Kohlehydratzyklus verläuft.

3. Verschiedene Zufuhrwege und Beziehungen der Ausscheidung zu den Normalwerten.

Die p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde anfangs, d. h. in Gruppe I der Tabelle 1, mit der Schlundsonde, späterhin aber subkutan zugeführt. Die durchschnittlichen Resultate legen wir in Tabelle 4 nieder.

Tabelle 4.

Tiergruppe	Durchschnittliche Ausscheidung in % der Zufuhr	Streuung des Kollektivs		Streuung des Mittelwertes		Korrelationskoeffizient
			in % des Durchschnitts		%	
I	18,3	6,63	36,5	1,0	5,5	− 0,02
II	8,8	5,12	58,2	0,93	10,6	− 0,36 ± 0,17
III	7,3	3,91	53,6	0,53	7,2	+ 0,03

Zuerst machen wir in der Tabelle auf die signifikant höhere Ausscheidung bei peroraler Zufuhr aufmerksam, was wir nur registrieren wollen*. Dabei ist die Streuung relativ nicht größer, ja sogar kleiner als bei subkutaner Gabe. Die Werte der Ausscheidungsgruppen II und III unterscheiden sich nicht wesentlich.

[4] EICHLER, O. u. R. SANDERS: Klin. Wschr. **1930**, 1618. Daselbst Literatur. — [5] ANSELMINO, K. J., O. EICHLER, u. H. SCHLOSSMANN: Biochem. Z. **205**, 481 (1929).

* Dieselbe Ausscheidung hatten früher schon HINDEMITH und BARFUSS bei peroraler Zufuhr derselben Dosis erhalten.

Uns interessiert noch die Frage, ob zwischen der Millonschen Reaktion bei dem unbehandelten Tier und der Belastung irgendeine stochastische Beziehung besteht, der wir durch die üblichen Korrelationskoeffizienten nahezukommen versuchen. Nach unserer Deduktion im letzten Abschnitt über Kompetenz würde man schließen, daß eine Belastung durch erhöhte Ausscheidung der Millon-Körper durch die neue Belastung die Ausscheidung verstärken würde. Der Koeffizient würde positiv werden. Das hätte natürlich zur Voraussetzung, daß alle durch die Millonsche Probe getroffenen Körper denselben Stoffwechselweg gehen. Ein der erwarteten Richtung entgegengesetzter Ausschlag findet sich in Gruppe II, allerdings nicht völlig signifikant*. Der Wert kommt dadurch zustande, daß auf zufällige Varianten als Basis sich eine „normale" Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure aufpfropft. Durch die Art der Rechnung ergibt sich dann eine negative Korrelation. Wir werden diesem Wert deshalb keine Bedeutung beimessen, zumal er nicht signifikant ist. Außerdem zeigen die Gruppen I und III (deren Tierzahl größer ist als von II), daß eine Beziehung nicht besteht.

4. Die Schädigung der Leber.

Unsere Tiere wurden mit Trinitrotoluol und später mit Tetrachlorkohlenstoff geschädigt. Trinitrotoluol wählten wir auf Vorschlag von Heubner[6], und zwar sollte die Dosierung von 150 mg/kg in Öl gelöst intraperitoneal verabreicht werden.

Zuerst gaben wir diese Menge bei 10 Tieren in 4% Lösung. Von diesen gingen uns nach einmaliger Behandlung 4 Tiere zugrunde, die anderen waren schwerkrank (Kachexie, starker Haarausfall fielen besonders auf). Als wir dieselbe absolute Menge 1%ig in Leinöl verabfolgten, blieben nicht nur die Todesfälle aus, sondern die Tiere zeigten nicht einmal wesentliche akute Vergiftungssymptome. Wir setzten die Vergiftung dann durch in größeren Abständen wiederholte Injektionen fort, um Todesfälle zu vermeiden und die Schädigung nur schwach zu halten. Zum Schluß des Versuchs erfolgten die Dosierungen häufiger in etwa 8—10 Tagen Abstand, aber die Dosis wurde auf 100 mg/kg reduziert. Sofort nach der Zufuhr wurde der Urin rot, durch ein farbiges Umwandlungsprodukt des Trinitrotoluols. Auf diese Weise wurde die Gruppe I unserer Tabelle 5 behandelt.

Gruppe II und III erhielten Tetrachlorkohlenstoff, und zwar je 1 cm^3/kg subkutan in Abständen von 2—3 Tagen. Anfangs haben wir folgenden Versuchsfehler begangen. Nach der Injektion blieben

* Die Berechnung der Streuung erfolgt wie üblich: $\sqrt{\frac{1-r^2}{n}}$.

[6] Heubner, W.: Mündliche Besprechung.

4 Ratten in einem engen Glasgefäß. Sie sind zugrunde gegangen. Der ausgeschiedene Tetra hatte sich der umgebenden Luft mitgeteilt, so daß eine weitere Abatmung nicht erfolgen konnte. Die Tiere zeigten histologisch das Bild einer Tetraschädigung an der Leber. Wenn die subkutane Gabe also sonst nicht in der gegebenen Menge zum Tode führt, so liegt das sichtlich an der raschen Ausscheidung durch die Lunge. Damit erklären sich die gegenüber der Enhalation viel geringfügigeren Leberschädigungen.

Wir geben zuerst in Tabelle 5 sämtliche erhaltene Daten wieder, nach den üblichen 3 Gruppen geordnet, obwohl wir nur bei der ersten Gruppe wiederholte Funktionsprüfungen vorgenommen haben.

Tabelle 5.

Nr.	Nach der ersten Schädigung			Nach der nächsten Schädigung				Quotient, Differenz, Streuung
	Durchschnitt 1	Streuung	$r_{1}/_{0}$	Durchschnitt 2	Streuung	$r_{2}/_{0}$	$r_{2}/_{1}$	
I	16,4	0,78	$-0,13$	13,9	0,88	$+0,11$	$+0,29 \pm 0,15$	3,4
II	14,9	0,87	$+0,56 \pm 0,15$					4,8
III	14,0	0,56	$+0,03$					8,7

Folgende Punkte dieser Tabelle müssen hervorgehoben werden: 1. Die Durchschnitte nach Behandlung mit Trinitrotoluol nehmen ab, d. h. es wird weniger ausgeschieden, während nach Tetrachlorkohlenstoff die Ausscheidung gestiegen war. Die Unterschiede waren signifikant, wie die letzte Kolonne zeigt.

Wie soll man diesen Befund verstehen? Eine histologische Kontrolle zeigt, daß die Tiere der Gruppe I schwerere Veränderungen aufwiesen*, als die sehr vorsichtig mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten**. Man könnte die Auffassung vertreten, daß die Tiere mit primär hohen Ausscheidungswerten die Tendenz nach abwärts, die anderen eine Tendenz nach aufwärts zeigen nach einem allgemeinen physiologischen Gesetz einer Gegenregulation. Diese Auffassung würde verlangen, daß zwischen den Ausscheidungswerten eine negative Korrelation besteht. Das trifft sichtlich nicht zu, wie ein Blick auf die Tabelle lehrt. Vor allen Dingen können wir aber Versuchsserien aufweisen, nach denen

* Eine Reihe von Tieren wurden noch 3 weiteren Vergiftungen ausgesetzt und wiederum geprüft. Jetzt wurden nur noch 6,7% wiedergefunden. Bei der vorhergehenden Funktionsprobe zeigten diese Tiere Werte oberhalb und unterhalb vom Durchschnitt.

** Die stärkste Steigerung der Ausscheidung von 8,3 auf 26,7% fanden wir nach Verabreichung von Lindenblütenextrakt (alkoholische Urtinktur des Homöopathischen Arzneibuches, 1 cm^3 von Alkohol befreit und in $^1/_2$ cm^3 H_2O aufgenommen, 5mal verabreicht im Abstand von 2—3 Tagen). Die Leber war hier völlig normal. Hier sehen wir in dem Lebertest den Befund eines pharmakologischen Angriffspunktes, den wir noch nicht als toxisch ansehen wollen.

bei leichter Vergiftung am Anfang die Ausscheidung anstieg, dann aber abfiel. In einem weiteren Versuch mit kleineren Dosen von Trinitrotoluol (100 mg/kg) stiegen übrigens die Ausscheidungszahlen auch an.

Wir suchten weiter in einer Nierenschädigung eine Ursache. Wenn die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure geschädigt wäre, würde die Zeit zur Umsetzung vermehrt werden. Tatsächlich fand sich häufig am nächsten Tage noch ein höherer Ausscheidungswert wie ihn jetzt Felix[3] auch beschrieben hat. Wir waren anfangs geneigt darin einen Hinweis auf eine komplizierende Nierenschädigung zu sehen, bis wir durch 2 Momente davon abgebracht wurden:

a) Diese verschleppte Ausscheidung fand sich verstreut immer.

b) Eine systematische histologische Kontrolle zeigte keine Beziehung zwischen Nierenläsion und Ausscheidung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure.

Das Prinzip der Kompetenz, wie es in den ersten Abschnitten dargelegt wurde, auf diesen Befund übertragen, würde bedeuten, daß bei leichterer Schädigung das die p-Oxyphenylbrenztraubensäure umsetzende Fermentsystem zuerst eine Schädigung erfährt, und zwar auch, wenn histologisch noch keine Änderungen merkbar sind. Später wird das Fermentsystem geschädigt, das die mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure in Konkurrenz tretende Stoffwechselprodukte anliefert. Diese Auffassung würde sich geschlossener gestalten, wenn die Normalausscheidung nach Schädigung deutlich geringer würde. Das trifft nicht zu, sie bleibt etwa gleich. Dabei ist allerdings zu beachten, daß die Herkunft der normalen, durch Millon-Reagens erfaßten Körper im quantitativen Ursprung unbekannt sind.

2. Von Bedeutung sind noch die Korrelationskoeffizienten. Von diesen hat nur einer einen signifikanten Wert, und zwar bei Gruppe II mit positivem Vorzeichen. Dieses Vorzeichen bedeutet, daß diejenigen Tiere, die bei der normalen Belastung eine höhere Ausscheidung zeigen, auch nach der Behandlung mit Tetra stärker geschädigt sind.

Ein Korrelat dazu ist eine Beobachtung aus der ersten Gruppe. In dieser Gruppe sind uns 9 Tiere nach der ersten Injektion von 150 mg/kg Trinitrotoluol noch vor der ersten Funktionsprobe ad exitum gekommen. Wenn man die bei der ersten Belastungsprobe erhaltenen Zahlen dieser Tiere statistisch behandelt, dann erhält man einen Durchschnitt der Ausscheidung von 24%. Die Differenz ist 2,9mal so groß als die Streuung der Differenz selbst, also ist sie nach der üblichen Anforderung als etwa signifikant zu bezeichnen. Die Ratten wiesen demnach schon eine leichte Leberschädigung auf, die sie empfindlicher machten gegen den ersten Trinitrotoluolstoß.

Auch diese Darstellung ist nicht frei von Gegenfragen, z. B. warum reagieren die durch Senkung der Ausscheidung von p-Oxyphenyl-

brenztraubensäure doch stärker geschädigten Tiere nicht auch stärker auf die wiederholte Giftzufuhr? Diese berechtigte Frage läßt sich wenigstens zum Teil mit Hinweisen aus der Literatur beschwichtigen. Die Trinitrotoluolvergiftung wirkt nicht tödlich durch eine reine Leberwirkung. Auch unsere gestorbenen Tiere hatten nie eine so starke Leberschädigung, daß dadurch der Tod erklärt werden könnte. Dann aber werden die nach Schädigungen gebildeten neuen Leberzellen unempfindlicher gegen Gift. Gerade die Tiere mit Trinitrotoluol wiesen histologisch sehr häufig Zellnekrosen auf. Zwischen den einzelnen Vergiftungen ließen wir immer eine ausreichende Zeit, um stärkere Tierverluste zu vermeiden.

3. Wenn man in Gruppe III keine Andeutungen irgendeiner Korrelation findet, so liegt das daran, daß bei Gruppe II die Streuungen besonders groß sind, es fanden sich also zahlreiche extreme Werte. Gerade diese, wenn sie zusammenhängen, sind geeignet, den Koeffizienten groß zu machen, solche Tiere sind allerdings auch am meisten geeignet, bestimmte Gesetzmäßigkeiten hervortreten zu lassen, die sonst in den vielfach entgegengesetzten Impulsen einfach untergehen. Die Andeutung einer Beziehung bei der Schädigung findet man im übrigen bei der Gruppe I bei dem dritten Versuch hervortreten, wenn man als Beziehungsobjekt die Prüfung nach der ersten Schädigung wählt ($r^2/_1$).

Die Probe von Felix, die sich beim Menschen[3] und auch bei Katzen[2] bewährte, bleibt bei Ratten unbefriedigend. Denn eine bestimmte Ausscheidungsquote kann hier 2 verschiedene Zustände der Leberfunktion anzeigen, die ungeschädigte Leber und die nach leichter Schädigung einsetzende schwerere. Da andererseits auch die Korrelation keine sehr enge stochastische Beziehung setzt, wird man im allgemeinen bei Ansatz einer Gruppe von Tieren nicht erwarten dürfen, daß die Durchschnittswerte eine Differenz, die am Anfang, d. h. vor der Schädigung, vorhanden war, jederzeit beibehalten. Das ist wichtig, weil man bei Festlegung verschiedener Punkte einer Kurve eher in der Lage ist, auch einzeln nicht signifikante Abweichungen schließlich zu einer ausreichenden Aussage benutzen zu können, indem man jeden folgenden Punkt von dem vorhergehenden für unabhängig nimmt und entsprechend statistisch behandelt.

Zusammenfassung.

Die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei der Ratte ist abhängig von dem allgemeinen Stoffwechsel, wird z. B. durch Aufenthalt der Versuchstiere bei höherer Temperatur und unter Thyroxineinwirkung vermehrt.

Von Substanzen, die die Leber schädigen, wie Trinitrotoluol und Tetrachlorkohlenstoff wirkte das erstere vermindernd, der zweite vermehrend auf die Ausscheidung. Der Unterschied wird — auch nach dem histologischen Bilde der Leber — auf eine stärkere Beeinträchtigung nach Trinitrotoluol zurückgeführt. Am besten geeignet zur Prüfung der Leberfunktion ist die Methode bei den ersten schwachen, histologisch nicht eindeutig fixierbaren Schäden. Hier wähle man die Belastung klein (30 mg/kg). Bei schwereren Schäden konnte man sich helfen durch höhere Dosierungen der p-Oxyphenylbrenztraubensäure ($>$ 40 mg/kg). Störend wirkte die Empfindlichkeit gegen Temperaturschwankungen.

Es wird versucht die Gesamtheit der Erscheinungen nach dem Prinzip der Kompetenz zu ordnen: Das p-Oxyphenylbrenztraubensäure und ähnliche Körper des normalen Stoffwechsels umsetzende Fermentsystem wird teils von dem normalen Stoffwechsel, teils von außen belastet. Die Umsetzung erfolgt durch gegenseitige Konkurrenz, wobei eine Beeinflussung der Endwerte sowohl von dem anliefernden als auch dem umsetzenden System selbst erfolgen kann. Es handelt sich also um eine Superposition zweier Wirkungen. Außerdem werden noch verschiedene Korrelationen aufgefunden und diskutiert.

Aus dem Strahleninstitut des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G., Berlin (Prof. Dr. H. Ruska).

Der Zerfall der alternden Erythrozyten-Membran in vitro.

Von

Bruno Lindemann.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. August 1948.)

Für die Ursache der der Spontanhämolyse zugrunde liegenden Permeabilitätsänderung der Membran wird von Wilbrandt eine Eiweißdenaturierung der Zellmembran angenommen. Ausgehend von der Vorstellung, daß eine solche Eiweißdenaturierung der Hülle zu sichtbaren morphologischen Strukturveränderungen führen dürfte, habe ich Hypotonie-Hämolysereste, die nach abgeschlossener Hämolyse weitgehend morphologisch intakt bleiben und sich daher als besonders brauchbare Untersuchungsobjekte erwiesen haben, auf morphologisch veränderte Erythrozytenmembranen untersucht.

Für die elektronenoptische Untersuchung der zerfallenden Erythrozytenmembranen wurde Zitratblut in sterilem Aqua dest. hämolysiert (1 Teil Blut auf 500 Teile Aqua dest.), nach abgeschlossener Hämolyse zentrifugiert, die Sedimente in steriler physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur suspendiert und nach $^1/_2$, 1, 2, 3, 4, 6, 24 und 36 Stunden erneut zentrifugiert, in der üblichen Weise mit OsO_4 fixiert, für die elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert und auf zerfallende Membranen durchgemustert. Im Parallelversuch wurden Sedimente in sterilem Aqua dest. suspendiert und in gleichen Zeitabständen durchgesehen.

Wir gehen von dem Bild einer normalen reifen Erythrozytenhülle der im peripheren Blut kreisenden roten Blutzelle aus. Die Abb. 1 gibt eine solche normale reife Erythrozytenmembran in der schlaffen Sphäroform mit den für die Ballonhülle so charakteristischen Faltenwürfen wieder, die nach abgeschlossener Hämolyse mit OsO_4 fixiert wurde. Nach 1—2 Stunden werden in den Sedimenten zuweilen Membranen gesichtet, die zum Teil fleckig erscheinen, und nach 4 Stunden finden sich ganz vereinzelt Sphäromembranen, die auf größeren flächenhaften Bezirken, manchmal auch nur auf ganz umschriebenen Arealen, ein feinporiges Netz erkennen lassen (Abb. 2). Noch deutlicher werden die Veränderungen an den in steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendierten Membranen, die nach 6 Stunden fixiert wurden. Die Oberfläche solcher Membranen sieht wie angenagt aus und es lassen sich jetzt auch deutlich unregelmäßige Substanzdefekte

nachweisen. Durch die unregelmäßigen Wanddefekte bekommt die zerfallende Hülle ein landkartenähnliches Aussehen. Auch in den

Abb. 1. Normale Erythrozytenmembran. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

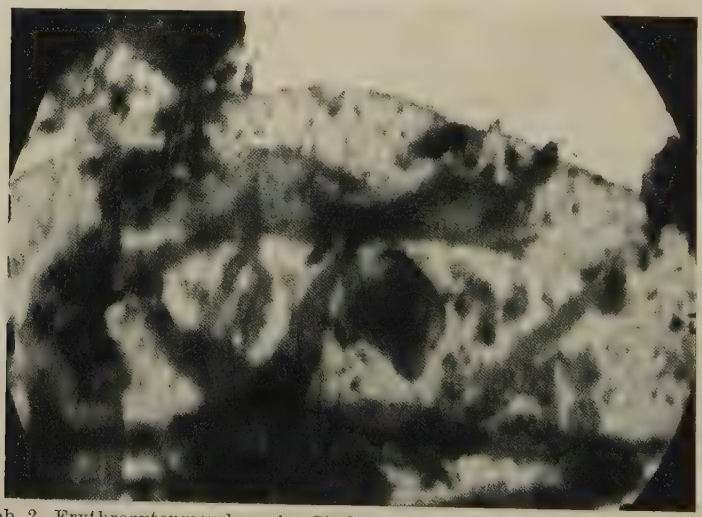


Abb. 2. Erythrozytenmembran im Stadium der beginnenden Fragmentation. Aus dem Sediment einer physiologischen Kochsalzsuspension. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

Membranduplikaturen der Falten fehlen unregelmäßige kleinere Membranteile. Nach 24 Stunden findet man im Sediment der Suspensionen manchmal Ansammlungen von eigentümlichem Zelldetritus, der vereinzelt noch in seiner Anordnung an Erythrozytenmembranen

erinnert, und der daher möglicherweise Reste von zerfallenden Erythrozytenmembranen darstellt (Abb. 3).

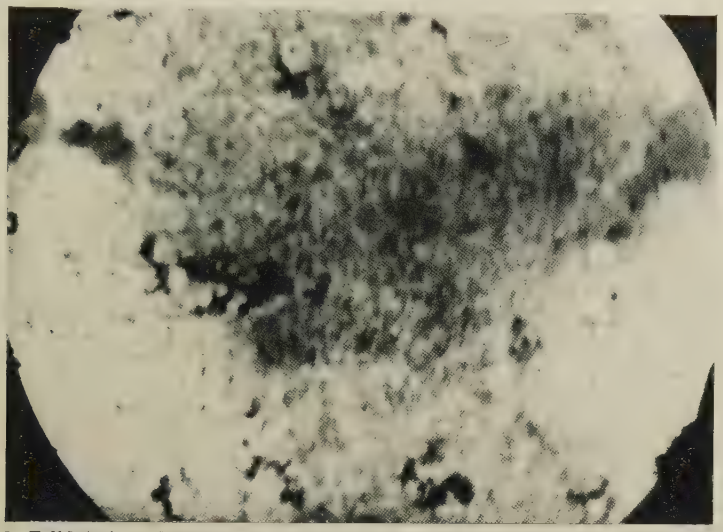


Abb. 3. Zelldetritus. Zerfallender und sich auflösender Stromarest? Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

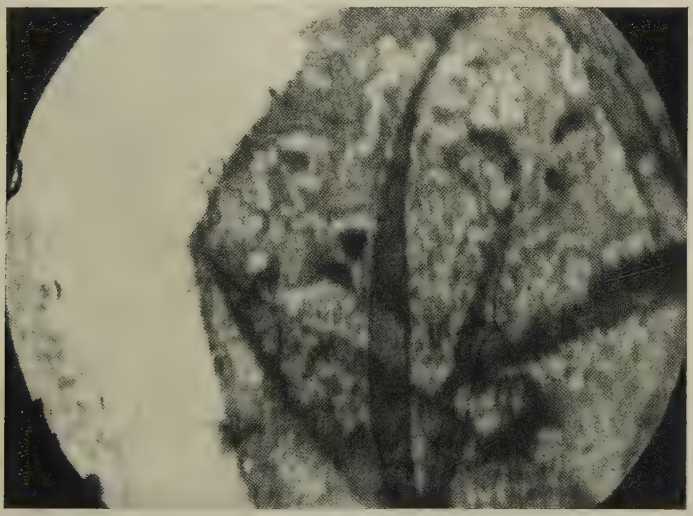


Abb. 4. Erythrozytenmembran im Stadium einer fortgeschrittenen Fragmentation. Aus dem Sediment einer Aqua dest.-Suspension. Osmiumfixation. El. opt. 1:18000.

Die in Aqua dest. suspendierten Hypotonie-Hämolysereste ergeben weitgehend übereinstimmende Befunde. Auch hier finden sich Erythrozytenmembranen mit dem eigentümlichen Porennetz, Membranen

im Stadium der Fragmentation (Abb. 4) und der erwähnte Zelldetritus, der noch Reste einer zerfallenen Membran darstellt. Sowohl der Grad der mit der Zeit zunehmenden morphologischen Strukturveränderungen der Membran als auch die Zahl der angetroffenen veränderten Hüllen lassen gegenüber den in physiologischer Kochsalzlösung erhobenen Befunden keine zahlenmäßig faßbaren Unterschiede erkennen. In beiden Medien fällt nur ein geringer Prozentsatz der Erythrozytenmembranen diesem Zerfallsprozeß anheim. Aus diesen Gründen läßt sich vermuten, daß es sich stets um absterbende alte Erythrozytenmembranen handelt; mit gewissen, aus klar ersichtlichen Gründen sich ergebenden Einschränkungen, kann darin ein dem physiologischen Alterungsprozeß roter Blutzellen analoger Vorgang gesehen werden. Weiterhin kann — ebenfalls mit gewissen Einschränkungen — gefolgert werden, daß auch bei einer spontan hämolysierenden Erythrozytensuspension an den alternden Erythrozytenmembranen ein Denaturierungsprozeß an der Stromatinhülle auftritt.

Literatur.

Gross, E., M. Bock u. Fr. Hellrung: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **200**, 276 (1942). — Heilmeyer, L.: Lehrbuch der speziellen pathologischen Physiologie. Jena: Gustav Fischer 1937. — Hirschfeld-Hittmair: Handbuch der allgemeinen Hämatologie, Bd. 2. Wien u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1932/34. — Jung, F.: Klin. Wschr. **1947**, Nr 29/30, 459. — Rous, P. and O. H. Robertson: Physiol. Rev. (Am.) **3** (1923). — J. exper. Med. (Am.) **25** (1917). — Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **20**, No 1. — Schilling, V.: Handbuch der Physiologie, Bd. VI, 2. Hälfte. Berlin: Springer 1928. — Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **245**, 22 (1942). — Schweiz. med. Wschr. **1940**, 731.

Aus dem Strahleninstitut des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. H. Holthusen) und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G., Berlin (Prof. Dr. H. Ruska).

Alles-oder-Nichts-Gesetz oder partielle Hämolyse?

Von

Bruno Lindemann.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. August 1948.)

In dem Sediment einer bei ausreichenden Diffusionsbedingungen eingetretenen Hypotoniehämolyse lassen sich elektronenoptisch die verschiedensten Übergänge von partiell hämolysierten Erythrozyten zu hämoglobinleeren Erythrozytenhüllen nachweisen. Vereinzelt erscheinen im mikroskopischen Blickfeld Erythrozyten, die noch beträchtliche Mengen von Hämoglobin im Innern enthalten (Abb. 1 und 2). So lassen sich z. B. im Sediment einer Aqua dest.-Hämolyse von 1:500 neben leeren Erythrozytenmembranen partiell hämolysierte Erythrozyten auffinden, die im isotonischen Milieu die Form von Scheiben annehmen, in denen sich das Hämoglobin am Rande angesammelt hat und die auf dem Leuchtschirm als Normozyten mit schmalem dunklen Randsaum erscheinen (Abb. 3 und 4). Im Konzentrationsbereich einer beginnenden Hämolyse liegen in einem mikroskopischen Blickfeld vollkommen intakte Erythrozyten neben hämoglobinleeren Erythrozytenhüllen und partiell hämolysierten Erythrozyten (Abb. 5 und 6). In konzentrierten Erythrozytensuspensionen mit kleinen Außenvolumina beobachtet man im Sediment vom Beginn einer Hämolyse bis zur vollständigen Lackfarbe an allen den Hämolyse anheimfallenden Erythrozyten entsprechend dem Hämolysegrad einen *allmählich* zunehmenden partiellen Hämoglobinverlust.

Die Frage, ob die Hämolyse sich durch die Zahl der vollständig hämolysierten Erythrozyten oder durch eine gleichmäßige Hämoglobinabgabe aller hämolysierenden Blutzellen abstuft, ist verschieden beantwortet worden. Von Dienes, Saslow und Parpart wurde für die Hypotoniehämolyse das Alles-oder-Nichts-Gesetz geltend gemacht, während Rusznyak, Baron und Franchini einen partiellen Hämoglobinverlust aller hämolysierenden Erythrozyten annehmen. Die vielfach als Kriterium für den Mechanismus verwandte Methode der lichtoptischen Zellzählung hämolysierender Erythrozyten ist nur bedingt brauchbar, da die verschiedenen Übergänge von hämolysierten Erythrozyten, namentlich bei stärkeren Hämolysegraden,

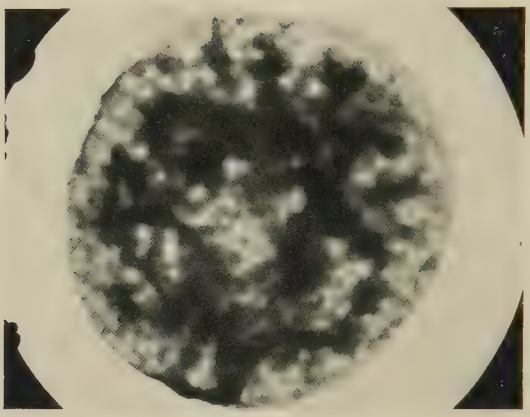


Abb. 1. Partiell hämolysierter Erythrozyt aus dem Sediment einer Aqua dest.-Hämolyse. (1:10.) Nach 30 Min. Hämolysedauer mit OsO_4 fixiert. El. opt. 1:9000.

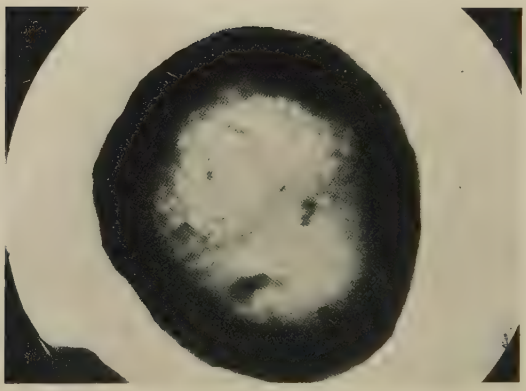


Abb. 2. Partiell hämolysierter Erythrozyt aus dem Sediment einer Aqua dest.-Hämolyse (1:10) nach 30 Min. Hämolysedauer für 1 Stunde in phosphatgepufferter Tyrodelösung (p_H 7) suspendiert; Osmiumfixation. El. opt. 1:9000.

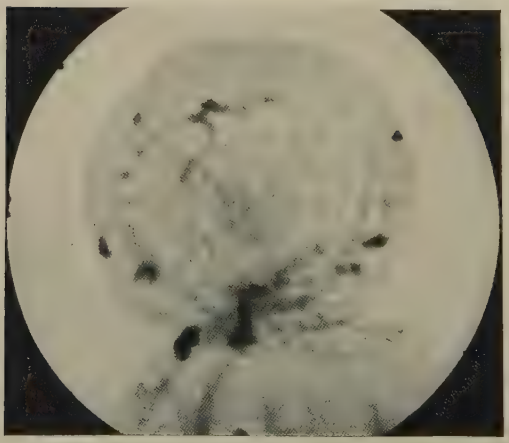


Abb. 3. Hämoglobinleere Erythrozytenmembran aus dem Sediment einer Aqua dest.-Hämolyse (1:500); Hämolysedauer 30 Min. Osmiumfixation. El. opt. 1:8500.

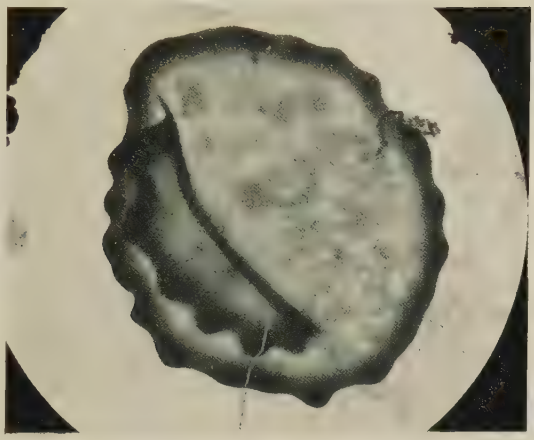


Abb. 4. Partiell hämolysierter Erythrozyt aus dem Sediment einer Aqua dest.-Hämolyse (1:500); nach 30 Min. Hämolysedauer für 1 Stunde in phosphatgepufferter Tyrodelösung (p_H 7) suspendiert und mit OsO_4 fixiert. El. opt. 1:9000.

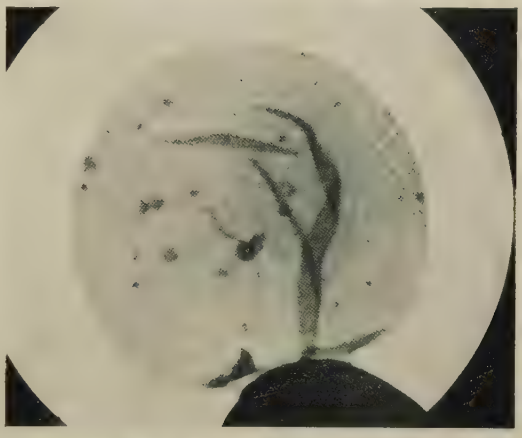


Abb. 5. Hämoglobinleere Erythrozytenmembran, am Rande intakter normaler Erythrozyt aus dem Sediment einer 0,4%igen Kochsalzlösung (1:10) nach 30 Min. Hämolysedauer. Osmiumfixation. El. opt. 1:9000.

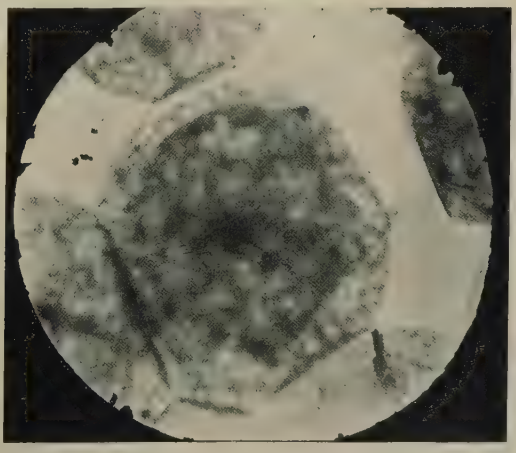


Abb. 6. Partiell hämolysierter Erythrozyt aus dem Sediment einer 0,3%igen Kochsalzlösung (1:10). Nach 30 Min. Hämolysedauer; Osmiumfixation. El. opt. 1:8500.

lichtoptisch nicht erfaßt werden können. Das führte dazu, daß z. B. Barón unter Heranziehung von quantitativen Hämoglobin- und Cholesterinbestimmungen auf Grund der lichtoptischen Befunde eine partielle Hämolyse ableitete, während unter gleichen Versuchsbedingungen Saslow zu gegenteiligen Ergebnissen kam und den Mechanismus nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip erklärte. Parpart ist der Ansicht, daß am hämolysierenden Erythrozyten in jedem Falle ein Diffusionsausgleich eintritt und wenn geeignete Diffusionsbedingungen vorliegen, die Zelle, wenn sie hämolysiert, vollständig hämolysiert. In einer neueren Arbeit hat Wilbrandt überzeugend dargelegt, daß ein Diffusionsausgleich bei der osmotischen Hämolyse nicht zustande kommt. Der Hämoglobingehalt hämolysierter Zellen wurde in einem Hämatokritröhrchen direkt kolorimetrisch mit der darüberstehenden Hämoglobinlösung verglichen und an dem aus intakten und partiell hämolysierten Zellen geschichteten Sediment nachgewiesen, daß sich die Hämolyse *sowohl* durch die Zahl der betroffenen Zellen als auch durch die Menge des von jeder einzelnen roten Blutzelle freigesetzten Hämoglobins abstuft. Zwar überwiegt im allgemeinen der erste Faktor, aber die Existenz einer partiellen Hämolyse ist nicht zu bezweifeln und wird durch die elektronenoptischen Befunde an hämolysierenden Erythrozyten erneut und hinreichend bewiesen.

Literatur.

Barón, J.: Pflügers Arch. **220**, 243 (1928). — Dienes, L.: Biochem. Z. **33**, 268 (1911). — Franchini, A.: Boll. Ist. sieroter. milan. **12**, 489 (1933). — Parpart, A. K.: Biol. Bull. (Am.) **61**, 500 (1931). — Rusznyak, S.: Biochem. Z. **36**, 394 (1911). — Saslow, G.: Quart. J. exper. Physiol. **19**, 329 (1929). — Wilbrandt, W.: Experientia **1**, Nr 3, 91.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Atemfrequenz und ihre Beeinflussung durch Narkotika bzw. Hypnotika bei der weißen Maus.

Von

Alfred Bänder.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. August 1947.)

Stoffwechselversuche sind mit guten verwertbaren Ergebnissen nur an geübten Menschen, dressierten, nicht narkotisierten Hunden, Ratten und am narkotisierten Tier, Katze oder Kaninchen, durchführbar. Bei den narkotisierten Tieren muß man den Einfluß des Narkotikums mitberücksichtigen und seine Größe auf den Stoffwechsel kennen.

R. Schleinzer und J. Antal[1] untersuchten aus diesem Grunde den Einfluß von Narkotika auf den respiratorischen Stoffwechsel des Meerschweinchens. Sie fanden eine Herabsetzung des Lungengaswechsels und eine Erniedrigung des Umsatzes, die auf eine Hemmung der Oxydation in den Zellen zurückgeführt werden soll. Weiter fanden sie, daß die Atmung parallel mit dem Stoffwechselgeschehen beeinflußt wird. Nach Kochmann[2] und Gremels[3] soll sich an Katze und Hund als gutes Narkotikum für Stoffwechseluntersuchungen die Chloralose bewährt haben, da durch sie am wenigsten die vegetativen Zentren beeinflußt werden.

Es sollten nun Stoffwechselversuche an der weißen Maus durchgeführt werden, und um die Motorik der Tiere auszuschalten, in der Narkose oder im hypnotischen Schlaf. Nun besitzen diese Tiere wegen ihrer Kleinheit und dazu relativen großen Oberfläche einen hohen Stoffwechsel. Daher wurde zunächst der Einfluß von Narkotika und Hypnotika auf den Sauerstoffverbrauch der Maus einer eingehenden Untersuchung unterzogen, um diese Größe kennenzulernen. Denn es liegt im Bereich der Möglichkeit, daß bei Tieren mit einem relativ hohen Umsatz auch ein größerer Einfluß durch Narkose- und Hypnosemittel hervorgerufen wird als bei größeren Tieren mit relativ niederem Umsatz. Nach Kochmann[4] und Bornstein[5] ist die Senkung des Umsatzes z. B. durch Chloralhydrat am Menschen um so größer, je höher er ist. In derselben Richtung liegt die Beobachtung von Siebert[6], der bei Stoffwechselgesunden keine Veränderung des Grundumsatzes durch Amytal fand, dagegen eine Herabsetzung bei Basedowkranken. Bernhardt und Bay[7] erhoben den gleichen Befund für das Luminal.

In ihrer Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch und die Atmung der weißen Maus wurden folgende Pharmaka untersucht: Äther, Chloralose, Chloralhydrat, Urethan, Evipan-Na, Veronal-Na und Luminal-Na.

Methodik.

Die Werte für den Sauerstoffverbrauch und die Atemfrequenz wurden immer gleichzeitig gemessen, da bei der hohen Atemtätigkeit der weißen Maus anzunehmen ist, daß die zur Bestreitung der Atemtätigkeit notwendige Sauerstoffmenge erheblich sein würde. So erschien uns die gleichzeitige Bestimmung von Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch an der narkotisierten und unnarkotisierten weißen Maus als ein unbedingtes Erfordernis.

Die Bestimmung der Atemfrequenz wird in dieser Arbeit als Maß für die Atemtätigkeit genommen.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs wurde folgende Apparatur zusammengestellt. Die Versuchstiere kamen in einen 16 cm langen und 2,7 cm Durchmesser betragenden Glaszylinder. Die Bewegungsfreiheit der Tiere war daher nicht sehr groß. Zur CO_2-Absorption wurde vor die Maus in einem Drahtgazepäckchen Natronkalk in den Zylinder gebracht. Durch den Verschlußstopfen ragte ein Thermometer in den Zylinderraum hinein. Aus einem kleinen Gasometer wurde der nötige Sauerstoff nachgefüllt. Weiter war mit dem Zylinder eine als Spirometer dienende 10-cm^3-Glasspritze verbunden. Zum luftdichten Abschluß und zum reibungslosen Gleiten des Spritzenstempels waren Zylinder der Spritze und Stempel gut mit Wasser befeuchtet und es wurde dafür gesorgt, daß immer einige Tropfen Wasser auf dem oberen Rande des Spritzenzylinders standen. Mittels einer Zeigerübertragung auf eine geeichte Skala wurde der Sauerstoffverbrauch mit einer Genauigkeit bis zu 0,05 cm^3 abgelesen. Die Temperatur des Versuchszylinders wurde durch eine 10 cm unter ihm aufgestellte automatisch regulierte Heizplatte auf 23—25° gehalten. Alle Sauerstoffwerte sind auf 760 mm Hg und 0° C korrigiert. Zu dem jeweiligen Barometerstand mußten wir immer noch 7 mm Hg-Druck des Spritzenstempels addieren. Alle Sauerstoffwerte in dieser Arbeit sind auf eine 20 g schwere Maus umgerechnet. Da die Beobachtungszeit unserer Versuche sich über mehrere Tage erstreckten, so betrug die Versuchszeit, das ist die Zeit in der die Mäuse in der Versuchsapparatur reinen Sauerstoff atmeten, am 1. Tage nur maximal 12 Stunden und an den weiteren Tagen 3—4 Stunden. Hierdurch wurde eine Schädigung durch die reine Sauerstoffatmung vermieden. Die Atemfrequenz wurde mit Hilfe einer Stoppuhr ausgezählt. Die Mäuse wurden für die Versuche nicht besonders ausgewählt. Auch wurden Männchen und nicht trächtige Weibchen benutzt. Die Versuche sind in der Zeit von November bis April durchgeführt worden.

Die Ernährung der Tiere bestand aus Hafer und Magermilch.

Die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Atemfrequenz.

Im Beginn der Versuche wurde eine große Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Atemfrequenz festgestellt. Bei Mäusen, die sich frei bewegen, liegt die sehr hohe Atemfrequenz zwischen 250—340, manchmal 400 Atemzügen/Min. Wenn man die Tiere in den Versuchszylinder brachte, zeigten sie zunächst immer die hohen Frequenzen, die dann innerhalb von 20—30 Min. auf Werte bis zu 180/Min. abklangen. Ebenso verminderte sich der Sauerstoffverbrauch. Abb. 1,

Kurve *I* veranschaulicht diese Beziehung. Die Punkte zwischen den Frequenzen von 340—180 sind Mittelwerte, gewonnen aus je 10 bis 15 Einzelbeobachtungen, angestellt an insgesamt 68 normalen Versuchstieren. Die Punkte zwischen den Frequenzen von 180—57 sind Mittel-

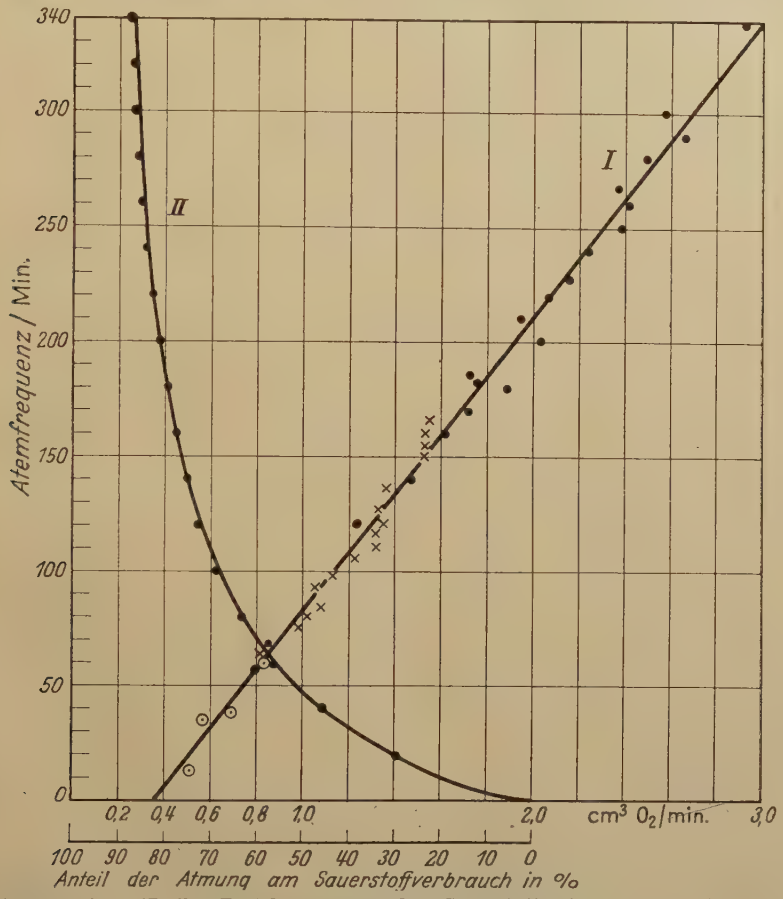


Abb. 1. Kurve I: Die Beziehungen zwischen Sauerstoffverbrauch und Atemfrequenz bei der weißen Maus. Nähere Erklärung im Text auf S. 621. — Kurve II: Prozentualer Anteil der Atemtätigkeit am Gesamtsauerstoffverbrauch.

werte aus durchschnittlich 5 Beobachtungen an 5 normalen Versuchstieren. Da diesen letzten Werten, wegen der geringen Zahl der Tiere keine Beweiskraft für den weiteren geradlinigen Verlauf der Kurve unter 180 Atemzüge/Min. zugemessen werden sollte, wurden noch weitere 10 Mäuse unter partieller Curarewirkung untersucht. Diese Ergebnisse wurden als (x) in die Kurve eingetragen. Jedes Kreuz stellt einen Mittelwert von je 3—5 Einzelbeobachtungen dar. Für die partielle

Curarisierung der Mäuse wurden 3,9—4,5 γ/g von dem uns zur Verfügung stehenden Curarin gegeben. Bei diesen Dosengrößen sank die Atemfrequenz für durchschnittlich 35 Min. auf die tiefen Werte bis zu 57 je Minute ab. Damit bestätigt sich der weitere geradlinige Verlauf bis herab zu geringer Atemfrequenz. Die eingekreisten Punkte stellen Einzelbeobachtungen zweier Versuche in Evipannarkose (Nr. 11 und 49) dar. Somit beträgt die Zahl der Einzelbeobachtungen, die zur Kurve *I* geführt haben, ungefähr 250.

Man findet also eine lineare Beziehung zwischen der Atemfrequenz und dem Sauerstoffverbrauch der Mäuse, die eine durchschnittliche Senkung der Atemfrequenz von 340 auf 180, das sind 47,1%, und innerhalb dieses Frequenzbereiches eine Sauerstoffabnahme von 3,0 auf 1,76 cm³/Min. = 41,3% erkennen läßt. Diese Zahlen würden besagen, daß der größte Teil des geatmeten Sauerstoffs für die Atemtätigkeit verwendet wird. Es ergibt sich bei der Berechnung der Werte auf 100%, daß bei einer Frequenz von 340/Min. 88% des geatmeten Sauerstoffs für die Atemtätigkeit und nur 12% O_2 für das „nicht atmende Tier", d. h. für den übrigen Stoffwechsel verbraucht werden. Aus den Daten der linearen Beziehung zwischen Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch läßt sich der O_2-Bedarf je Atemzug zu 0,0078 cm³ berechnen. Es ist also der Sauerstoffverbrauch je Atemzug von der Frequenz unabhängig.

GROEBBELS[8] fand eine ähnliche Gesetzmäßigkeit zwischen der Atemfrequenz und dem Sauerstoffverbrauch bei kleinen Vogelarten. Er berechnet allein aus der Atemfrequenz den Stoffwechsel der Tiere. Da der „nichtatmende Organismus" unabhängig von der Atemfrequenz immer den gleichen Sauerstoffverbrauch hat — der z. B. unter Zugrundelegung obiger Daten 12% von 3,0 cm³ bei 340 Atemzügen/Min. = 0,38 cm³ O_2/Min. beträgt —, muß zwangsläufig der prozentuale Anteil der Atmung am Gesamtsauerstoffverbrauch mit sinkender Atemfrequenz abnehmen.

Um einen genaueren Einblick in dieses Problem zu bekommen, wurde der prozentuale Sauerstoffbedarf der Atemtätigkeit für die verschiedenen Frequenzen in je Zwanziger-Intervallen interpoliert. Die Werte unterhalb 57 Atemfrequenzen in der Minute wurden extrapoliert. Da es gewagt ist, bei biologischen Funktionen zu extrapolieren, wurden als Beweis für den weiteren geradlinigen Verlauf der Kurve *I* Daten aus zwei Narkoseversuchen zur Hilfe genommen, bei denen Atemfrequenzen bis zu 34 und 13 Min. beobachtet wurden. Diese in die Kurve *I* eingesetzten Daten (○) wurden mit dem Stoffwechselwert des Evipans (s. unten S. 631) umgerechnet. Damit sind sie den entsprechenden Werten einer unbehandelten Maus bei 43 bzw. 13 Atemzüge/Min. gleichzusetzen. Abb. 1, Kurve *II* gibt diese Resultate

wieder. Man sieht, wie mit sinkender Atemfrequenz der prozentuale Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch abnimmt, und zwar ist die Abnahme bei den hohen Frequenzen langsamer als bei den niederen. Die Werte liegen auf der Kurve einer Exponentialfunktion. Weiter erkennen wir, daß bei der Atemfrequenz von 47 der Sauerstoffverbrauch für die Atemtätigkeit gleich dem des übrigen Stoffwechsels geworden ist. Bei Frequenzen unter 47 liegt der prozentuale Anteil der Atmung unter dem des übrigen Stoffwechsels. Die obige Überlegung wird auch aus Beobachtungen von Narkoseversuchen bestätigt, bei denen z. B. im Versuch Nr. 11 ein tiefster O_2-Verbrauch von 0,13 cm³/Min. = 92% Senkung und eine Atemfrequenz von 13/Min. gefunden wurde. Würde man hiervon noch den hohen prozentualen Anteil für die Atmung von z. B. 340/Min. in Rechnung setzen, dann wäre für das Tier nicht mehr genügend Sauerstoff übrig geblieben. Es gehen aber von den 0,13 cm³ nur 17,5% für die Atemtätigkeit (13 Atemzüge) ab. Demnach bleiben für den Stoffwechsel des nicht atmenden Tieres" noch 0,11 cm³/Min. übrig, die zur Erhaltung des Lebens vollkommen ausreichen. Auf ein Kilogramm Maus umgerechnet sind dies noch 5,50 cm³ O_2/Min. (Im Vergleich hierzu der Sauerstoffverbrauch je Kilogramm Mensch = 3,62 cm³ O_2/Min.) Bei Versuch Nr. 49 lagen die Verhältnisse mit folgenden Daten analog: O_2-Verbrauch = 0,192 cm³/Min., Atemfrequenz = 38/Min. Nach Abzug von 45% für die Atemtätigkeit bei dieser Frequenz bleibt noch ein Sauerstoffverbrauch von 0,11 cm³/Min. übrig.

Der erstaunlich hohe prozentuale Sauerstoffverbrauch für die hohen Atemfrequenzen läßt sich aus der großen Zahl der Atemzüge in bezug auf die kleine Masse der Tiere hinreichend erklären. Ganz anders liegen die Verhältnisse bei großen Tieren und dem Menschen mit niederen Frequenzen.

Nach der Literatur sind folgende Zahlen für die Atemtätigkeit bei anderen Tierarten und Menschen bekannt. Es fanden Kahlson und Peil[9], daß bei Katzen 4—10% und bei Hunden 4—12% des Grundumsatzes für die Atemtätigkeit verbraucht werden. Für den Menschen finden sich Werte von 10% Tab. biologic.[10], Liljestrand[11] gibt mit 1—3% und Müller[12] mit 3,7—5,4% den Anteil der Atemtätigkeit am Grundumsatz an.

Ein interessanter Vergleich wäre der Sauerstoffverbrauch des Organismus nach Abzug des prozentualen Anteils für die Atmung. Für einen Menschen von 62,8 kg rechnet man demnach bei einem Ruhewert von 227,9 cm³ Gesamtsauerstoffverbrauch/Min. 3,41 cm³ O_2/kg Min. Für die Maus nach Wegfall des hohen prozentualen Sauerstoffverbrauchs für die Atmung erhält man einen Wert von 18,29 cm³ O_2/kg Min. bei Zugrundelegung eines Ruhe-Gesamt-O_2-Verbrauchs von 1,76 cm³/Min. und 180 Atemzüge/Min. Dies ergäbe ein Verhältnis von 1:5,37. Das heißt, daß der Sauerstoffverbrauch der „nicht atmenden Maus" gegenüber dem des Menschen 5,3fach gesteigert ist. Wenn man dagegen diese Überlegung ohne die Berücksichtigung des prozentualen Anteils der Atmung anstellt, also

die absoluten Sauerstoffwerte zueinander in Beziehung setzt, dann berechnet sich der Stoffwechsel der Maus auf das ungefähr 25fache gegenüber dem des Menschen.

Der Grund für diesen so hohen Sauerstoffverbrauch der Maus ist darin zu suchen, daß diese Tiere wegen ihrer relativ großen Oberfläche mehr Wärme abstrahlen, als es bei den umgekehrten Verhältnissen der Fall wäre. Um eine homoiotherme Körpertemperatur zu gewährleisten, muß der kleinere Organismus mehr Wärme erzeugen. Da er im eigentlichen Stoffwechsel normal keine erheblichen Steigerungen vollbringen kann, wird hier die Atemmuskulatur durch ihre hohe Tätigkeit und dem dazu benötigten O_2 quasi als Wärmemaschine benutzt.

In den nun folgenden Versuchen wird der Grad der Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs mit der jeweils dazu gehörigen Atemfrequenz durch Narkotika und Hypnotika untersucht. Die angegebenen prozentualen Werte für die Atemfrequenz und den respiratorischen Stoffwechsel sind immer von den Ruhewerten aus gerechnet, auf die die Tiere sich ohne Narkotikum nach 30—60 Min. einstellten.

Äther.

Bei den Ätherversuchen wurde derselbe in einer Menge von 0,0416 Vol.-% dem Sauerstoff zugesetzt. In diesem Gemisch blieben die Tiere durchschnittlich 30 Min. Es wurde die Einwirkung des Äthers solange fortgeführt, bis die Atemfrequenz auf 150—120 abgesunken war. Das Absetzen des Äthers geschah bei manchen Versuchen schon nach 25 Min., bei anderen bis nach 40 Min. Die Tiere zeigten dabei Seitenlage. Danach wurde wieder reiner Sauerstoff zugeführt. Blieben die Tiere länger als 50 Min. in obigem Äthergemisch, dann trat der Tod durch Atemlähmung ein. Der Atemstillstand setzte plötzlich ein. Die Atemfrequenz sank nicht etwa langsam auf 80 oder bis 50 herab. Es erwies sich die Maus als sehr empfindlich gegenüber dem Äther. Schon geringe Überdosierungen führten zum Atemstillstand. Bei den Ätherversuchen beobachtete man am Anfang ein plötzliches starkes Absinken der Atemfrequenz z. B. von 210 auf 170. Diese primäre Einwirkung des Äthers könnte man als einen angedeuteten HOLMGREN-KRETSCHMERschen Reflex deuten.

Ähnliche Beobachtungen wurden durch G. MANSFELD und TYUKODY[13] gemacht. Während BIERHAUS[14] keine Beeinflussung oder sogar eine Steigerung der Atemfrequenz beim Menschen unter Ätherein wirkung findet. MEYER[15] beobachtete eine Steigerung der Atmung beim Menschen um 35%, wenn ein 5%-Äther-Luftgemisch geatmet wurde, und bei einem 10%-Gemisch eine Einschränkung.

Parallel zum Absinken der Atemfrequenz in unseren Versuchen wurde auch eine Einschränkung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet (Abb. 2). Es trat eine durchschnittliche Senkung der Atemfrequenz nach 35 Min. um 47,8% und des Sauerstoffverbrauchs nach 39 Min. um 63,3% auf. Verfolgt man die Atemfrequenz und den Sauerstoff-

verbrauch weiter, so sieht man, daß sich die Tiere in bezug auf die Atmung schon wieder nach 2 Stunden erholt haben, während noch eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs um 17,4% bestehen bleibt, die in dieser Größe noch um 5 weitere Stunden anhält. Nach 24 Stunden finden wir noch eine Senkung im respiratorischen Stoffwechsel von 10,5%, nach 48 Stunden von 7,0% und erst nach 72 Stunden sind wieder die normalen Verhältnisse erreicht. Diese lange Depression im Sauerstoffverbrauch kann man als eine Stoffwechselwirkung deuten, und zwar derart, daß entweder der Äther zentral an Stoffwechselzentren, oder aber, was wahrscheinlicher ist, an jeder Körperzelle für sich angreift.

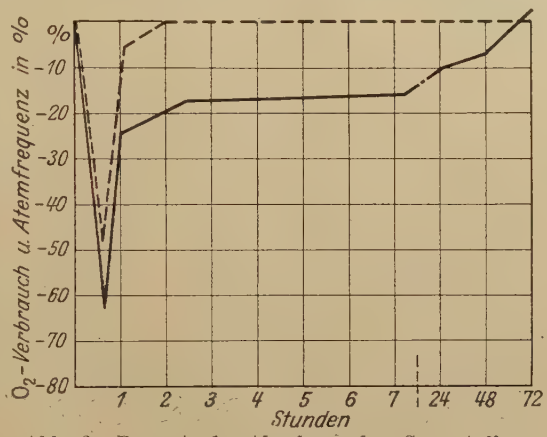


Abb. 2. Prozentuale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs ——— und der Atemfrequenz — — — durch die Einwirkung des Äthers (0,0416 Vol.-%) bei der weißen Maus. Mittelwerte von 8 Versuchen.

Die Länge der Wirkung kann man mit der Länge der Ausscheidungszeit in Beziehung setzen. So wird nach Versuchen von Ronzoni[16] innerhalb der ersten Stunde nach der Narkose der größte Teil des Äthers ausgeschieden. Am Ende der Narkose fand er 140 bis 170 mg-% im Blut. Nach einer Stunde 17—34 mg-%. Nicloux[17] konnte nach 2 Stunden 6 mg-% Äther im Blut nachweisen, während Graméns[18] selbst nach 48 Stunden 0,08% im Blute vorfand. Aus diesen Daten ersieht man, daß sich die Ausscheidung auf der Kurve einer Exponentialfunktion vollzieht. Henderson[19] gelang es auch, diese Gesetzmäßigkeit in diesem Sinne mathematisch auszudrücken.

Parallel zum exponentialen Verhalten der Ausscheidung läuft auch die Erholung der Mäuse in bezug auf die Atemfrequenz und den Sauerstoffverbrauch. Es sind auch hier $1^1/_2$ Stunden nach Absetzen des Äthers die stärksten Einwirkungen desselben wieder verschwunden. Im Sauerstoffverbrauch folgt ein langsamerer Anstieg bis zum Normalwert. Bei der Betrachtung der Abb. 2 sieht man, daß das Absinken des Sauerstoffs durch 2 Komponenten bedingt ist. Erstens am Anfang der Kurve durch die gleichzeitige Atemfrequenzverminderung, und zweitens, was im zweiten Teil der Kurve deutlich wird, durch eine hemmende Wirkung des Äthers auf den Stoffwechsel. Im ersten Teil der Kurve kommt es zu einer Überlagerung dieser beiden Komponenten. Nach der Kurve *I*, Abb. 1 läßt sich die reine stoffwechselsenkende Komponente des Äthers berechnen. Die durchschnittlichen Ausgangs-

werte dieser Versuchsreihe betrugen 242 Atemzüge/Min. und 2,28 cm³ Sauerstoff/Min. Wir finden durch den Äther eine Abnahme der Atemfrequenz auf 127/Min. = 47,6% und eine Sauerstoffverbrauchssenkung auf 0,84 cm³/Min. = 63,3%. Nach obiger Kurve gehört aber zur Atemfrequenz 127 ein Sauerstoffverbrauch von 1,34 cm³/Min. Es ergäbe sich daher nur eine lediglich durch das Absinken der Atemfrequenz bedingte Stoffwechselsenkung von 41,2%. Es ist also durch den Äther der Sauerstoffverbrauch um 22,1% stärker abgesunken, als es der Atemfrequenz entsprechen dürfte. Diese Zahl würde damit die reine durch den Äther bedingte senkende Komponente im respiratorischen Stoffwechsel nach 37 Min. bedeuten.

Diese Hemmung geht dann langsam zurück, um nach 2 Stunden bei wieder normaler Atemfrequenz den Wert von —19% zu erreichen. Aus dieser Überlegung heraus sieht man, daß der Äther nicht nur auf das Atemzentrum, sondern auch auf den gesamten respiratorischen Stoffwechsel sofort hemmend wirkt.

Chloralose.

Als nächstes Narkotikum wurde die Chloralose untersucht. Die Dosierung betrug 4,3 mg/100 g subkutan. Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch unter Chloralose haben prinzipiell den gleichen Kurvenverlauf wie beim Äther (Abb. 3). Die Kurven zeigen gegenüber dem Äther ein verbreitertes Bild. Die Wirkung der Chloralose setzt später ein. Die Atemfrequenz hat nach 82,7 Min. mit 62,2% Senkung und der Sauerstoffverbrauch nach 104 Min. mit 56% ihre tiefsten Punkte erreicht. Erst nach 5 Stunden 48 Min. ist die Atemfrequenz zur Norm zurückgekehrt. Es tritt also eine zeitliche Verzögerung um knapp 4 Stunden gegenüber dem Äther auf. Der Sauerstoffverbrauch steigt bis zu 3 Stunden 30 Min. schnell auf —30% an, um dann bis zur 10. Stunde mit leichter Steigung —15% zu erreichen. Nach 48 Stunden sind die alten Verhältnisse im respiratorischen Stoffwechsel wieder hergestellt. Es ist also auch hier bei wieder normaler Atemfrequenz eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs über Stunden um durchschnittlich 20% zu erkennen.

Dagegen fanden Griffith jr., R. Fred, F. E. Emery und Lockwood[20] bei Katzen unter Chloralose eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs um 7%. Bijlsma[21] beobachtete nach Chloralose bei Ratten nicht immer eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs. Die günstigen Befunde der Chloralose in bezug auf die vegetativen Zentren der Fleischfresser Katze und Hund, wie sie von Gremels[3] und Kochmann[2] erwähnt werden, gelten demnach für die Atmung und den respiratorischen Stoffwechsel der Maus nicht.

Stellt man nun die gleiche Überlegung wie oben beim Äther an, um die reine Wirkung auf den Gewebsstoffwechsel zu berechnen, so findet man schon allein aus der Betrachtung der Werte —62,2% für die

Atmung und —48,5% für den dazugehörigen Sauerstoff, daß hier im Verhältnis zum Absinken der Atemfrequenz mehr Sauerstoff verbraucht worden ist. Rechnerisch erhält man für eine Frequenzsenkung von 62,2% einen Wert von 53,1% für den Sauerstoff. Empirisch sind es aber nur —48,5%. Es ist also ein Mehrverbrauch an Sauerstoff von 4,6% eingetreten. Von diesem Punkt an ändern sich die Verhältnisse. Die Atemfrequenz nimmt wieder zu, während der Sauerstoffverbrauch weiter abfällt. Es muß also nun die Wirkung auf den Gewebsstoffwechsel durch die Chloralose eingesetzt haben. 12 Min.

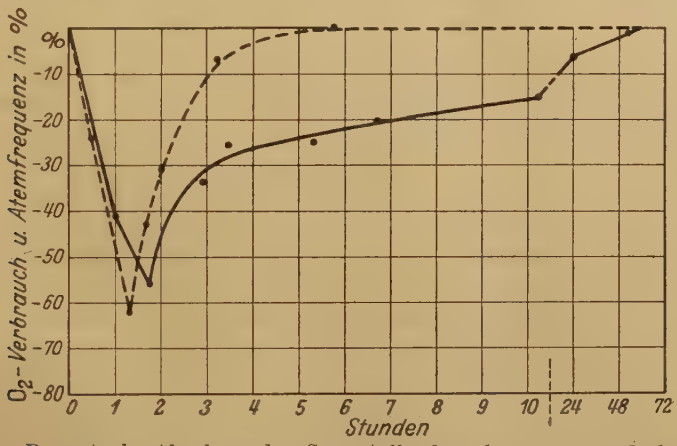


Abb. 3. Prozentuale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs ——— und der Atemfrequenz — — — durch die Einwirkung von 4,3 mg/100 g Chloralose bei der weißen Maus. Mittelwerte von 7 Versuchen.

später beim Schnittpunkt beider Kurven erhält man folgendes Bild. Zu einer Atemfrequenzsenkung von 51,5% würde ein Sauerstoffverbrauch von 44,4% gehören. Der Versuch ergibt aber eine Abnahme um 51,5%. Wir finden also schon 12 Min. danach eine Hemmung im Gewebsstoffwechsel um 7,1%. Weitere 12 Min. später beim tiefsten Sauerstoffwert haben wir eine Hemmung von 21,4% und nach einer weiteren Stunde 15 Min. von 20,3%. Dieser Grad bleibt dann bis zur 7. Stunde etwa erhalten. Aus diesen Daten sieht man, daß durch die Chloralose zuerst eine Hemmung der Atmung einsetzt bei gesteigertem Sauerstoffverbrauch, und dann erst der senkende Einfluß auf den Gewebsstoffwechsel sich einstellt.

Chloralhydrat.

Als weiteres Narkotikum bzw. Hypnotikum wurde das Chloralhydrat untersucht. Es wurde in Dosen von 10 und 30 mg/100 g in Tragant als Einhüllmittel subkutan gegeben. Wie die Abb. 4 zeigt,

kommt es bei der Dosierung von 30 mg/100 g nach 15,3 Min. zu einer Senkung der Atemfrequenz um 47% und nach 29 Min. ist mit einer Abnahme von 39,5% der tiefste Sauerstoffverbrauch erreicht. Von da ab steigen Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch fast linear bis zur Norm an und erreichen nach 2 Stunden 23 Min. und 2 Stunden 45 Min. die Ausgangswerte. Bei der Dosierung von 10 mg/100 g ist die Wirkung noch geringer und kürzer. Nach 22,5 Min. sind Atemfrequenz mit —12,6% und Sauerstoffverbrauch mit —17,3% auf dem tiefsten Werte angelangt. Nach 1 Stunde 10 Min. und 1 Stunde 44 Min. sind die normalen Ausgangswerte wieder erreicht.

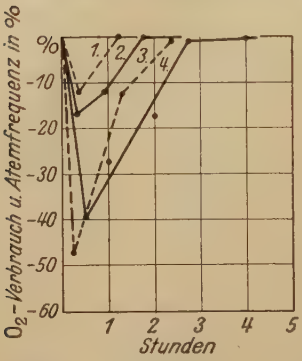


Abb. 4. Prozentuale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs ——— und der Atemfrequenz – – – durch die Einwirkung von 10 mg (Kurve 1 und 2) und 30 mg (Kurve 3 und 4) Chloralhydrat je 100 g bei der weißen Maus. Mittelwerte von je 3 Versuchen.

Eine sehr geringe Beeinflussung des respiratorischen Stoffwechsels durch Chloralhydrat fanden auch BORNSTEIN[5] und BORNSTEIN und HOLM[22] an Stoffwechselgesunden, während der senkende Einfluß auf den Sauerstoff um so größer war, je mehr der Umsatz des Menschen gesteigert war (Tabelle 1). T. HOSHI[23] findet eine Abnahme der Atemfrequenz beim Kaninchen während W. RABINOWITSCH[24] eine Erhöhung der Atemfrequenz beim Menschen feststellte. LINDHARN[25] und WIELAND[26] konnten zeigen, daß die Beeinflussung der Atemfrequenz auf eine Herabsetzung der Erregbarkeit des Atemzentrums durch Chloralhydrat beruht.

Die eigentliche Stoffwechselwirkung des Chloralhydrats bei unseren Versuchen ist nur gering. Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch gehen ziemlich parallel und mit einer Differenz nur von 20—30 Min. erreichen beide wieder die Ausgangswerte.

Tabelle 1.

Grundumsatz	Senkung durch 1,5 g Chloralhydrat in Prozent beim Menschen
Mehr als 10% unter der Norm	4
Normal	11
Bis 50% über der Norm . . .	15
Über 50% über der Norm . .	42

Ein ganz anderes Wirkungsbild des Chloralhydrats bekommt man, wenn man es ohne ein Einhüllmittel subkutan spritzt (Tabelle 2).

Durch die Reizung des Gewebes kommt es nach Stunden zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. Nach einer anfänglichen geringen Erhöhung um 7% ist der Sauerstoffverbrauch nach einer Stunde wieder normal, um bis zur 2. Stunde mit —4% etwas unter die Norm zu sinken. Diese Abnahme wäre der hypnotischen Wirkung zuzuschreiben. Von da an finden wir eine stete Steigerung im Sauerstoffverbrauch, die

nach 7 Stunden +17% und nach 24 Stunden +47% erreicht. Auch die Atemfrequenz ist von der 3. Stunde ab bis zur 24. um 4,8—6,65% erhöht.

Urethan.

Einen noch weit geringeren Einfluß in bezug auf Intensität und Dauer der Wirkung auf Atmung und Stoffwechsel zeigt das Urethan. Es wurde in 2 Dosierungen zu 50 mg/100 g und 100 mg/100 g subkutan gegeben. Bei 50 mg/100 g konnte man keine Beeinflussung der Atemfrequenz und des Sauerstoffverbrauchs beobachten. Bei der Dosierung von 100 mg/100 g zeigte sich eine geringe Senkung der Atemfrequenz um 8,4% nach 23 Min. und des Sauerstoffverbrauchs um 26,7%. Nach 45 Min. hatte die Atmung wieder den Ausgangswert und der respiratorische Stoffwechsel nach 1 Stunde 45 Min. —1,8% erreicht (Tabelle 3).

Tabelle 2. *Wirkung des Chloralhydrats ohne Einhüllmittel (subkutan) auf den Sauerstoffverbrauch und die Atmung der weißen Maus in Prozent. 10 mg/100 g Mittelwerte von 6 Versuchen.*

Zeit	O_2-Verbrauch %	Atemfrequenz %
10 Min.	+ 7,5	+7,45
20 Min.	+ 7,14	+5,3
60 Min.	+ 0,78	+5,7
120 Min.	— 3,6	—4,0
140 Min.	+ 3,2	0
3 Stunden . .	+ 5	+4,8
7 Stunden . .	+17,4	— 6
24 Stunden . .	+47,0	+6,6

Von D. Peng[27] wurde eine ähnliche Beobachtung am Kaninchen gemacht. Er fand, daß 12,5 mg/100 g die Atmung nicht wesentlich beeinflussen, und bei 25 mg/100 g eine Senkung der Atemfrequenz um 10—20%, bei 50 mg/100 g um 20—40% und bei 100 mg/100 g um höchstens 50% stattfindet. Bijlsma[21] fand bei Ratten in Urethannarkose eine Abnahme der Atemfrequenz und des Sauerstoffverbrauchs, während A. Eckstein und E. Rominger[28] bei Säuglingen keine Störung der Atmung durch Urethan beobachteten. Yamano[29] sah nur eine geringfügige Senkung des respiratorischen Stoffwechsels in leichter Urethannarkose.

Tabelle 3. *Urethanwirkung (100 mg je 100 g) auf die Atemfrequenz und den Sauerstoffverbrauch der weißen Maus in Prozent. Mittelwerte aus 4 Versuchen.*

Zeit in Min.	O_2-Verbrauch %	Atemfrequenz %
23	— 26,7	— 8,4
45	— 18,0	0,0
105	— 1,8	0,0

Bei der Betrachtung unserer Werte sieht man, daß die Senkung des Sauerstoffverbrauchs größer ist, als sie der Atemfrequenz entsprechen würde. Und zwar dürfte sich bei einer Atemfrequenzminderung von 8,4% nur ein Sauerstoffverbrauch von —6,9% ergeben, wenn keine Beeinflussung durch Urethan im Gewebsstoffwechsel stattfände. Wir finden aber empirisch einen Wert von 26,7%. Der Unterschied von 19,8% ist als die Größe der Hemmung im Gewebsstoffwechsel nach 23 Min. anzusehen. Nach 45 Min. hat die Atemfrequenz ihren Ausgangswert wieder erreicht. Die reine Stoffwechselsenkung beträgt dann immer

noch 18%. Nach 2 Stunden 45 Min. ist sie auf —1,8% zurückgegangen. Aus dieser direkten Senkung im Sauerstoffverbrauch kann man auf eine sofortige Hemmung im Stoffwechsel durch Urethan schließen.

Aus der Reihe der Barbitursäurederivate wurden drei Körper untersucht, und zwar das Evipan-Na, Veronal-Na und Luminal-Na.

Evipan-Na.

Das Evipan wurde in Dosen von 10 mg auf 100 g subkutan gegeben. In Mol ausgedrückt sind dies 39 Mikromole. Mit dieser Menge erzielt man Schlafzustände der Tiere. Das Kurvenbild (Abb. 5) ähnelt dem des Äthers, nur daß hier nach 24 Stunden alle Funktionen wieder normal ablaufen. Nach 19,25 Min. bzw. 20 Min. haben Atmung und Sauerstoffverbrauch mit 56,2% bzw. 72,6% ihre tiefsten Punkt erreicht. Die Atemfrequenz steigt dann schnell an und erreicht nach 2 Stunden 30 Min. wieder die Ausgangswerte. Analog hiervon nimmt auch der Sauerstoffverbrauch bis zur 2. Stunde zu, um dann langsam in flacher Kurve nach 24 Stunden die Normalwerte wieder zu erreichen. Wir finden also auch beim Evipan eine Wirkung auf das Atemzentrum und den Gewebstoffwechsel.

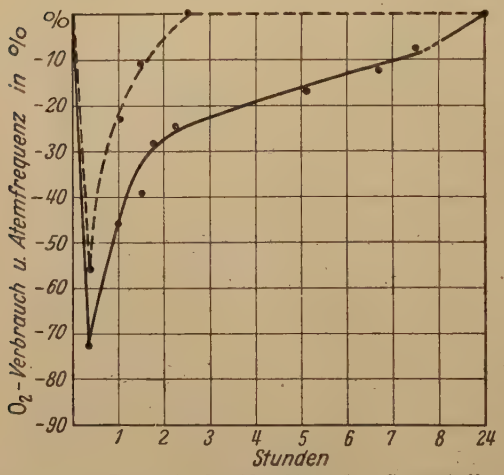


Abb. 5. Prozentuale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs ——— und der Atemfrequenz — — — durch die Einwirkung von 10 mg Evipan je 100 g bei der weißen Maus. Mittelwerte von 10 Versuchen.

LEHMANN[30] beobachtete beim Evipan, Veronal und Luminal in toxischen Dosen an Hunden, Katzen und Kaninchen eine fortschreitende lähmende Wirkung auf das Atemzentrum bis zum Atemstillstand. Evipan wirkt dabei am schnellsten. Nach NOWAK[31] soll die schädigende Wirkung auf die Atmung bei Hunden gering sein. Den gleichen Befund machte C. J. STORM[32] für Affen. Die Angaben über die Beeinflussung des respiratorischen Stoffwechsels durch die Barbiturate sind in der Literatur sehr verschieden. Am häufigsten findet man die Mitteilung, daß die Einschränkung des Sauerstoffverbrauchs sich erst dann einstellt, wenn gleichzeitig eine Schädigung der Atmung zu beobachten ist. KAYS und WELLS[33], BIJLSMA[21] und M. O. LEE[34], M. KLEIBER und F. J. SAUNDERS[35] fanden eine Senkung im Sauerstoffverbrauch bei Ratten durch Amytal um 80%.

Bei unseren Werten findet man wieder eine stärkere Abnahme des Sauerstoffverbrauchs im Verhältnis zur Atemfrequenz. Es dürfte

bei einem Atemfrequenzrückgang von 56,2% nur eine Senkung im Sauerstoffverbrauch von 47% zu verzeichnen sein. Wir finden aber den Wert —72,6%. Damit hätten wir nach 19—20 Min. schon eine „reine" Stoffwechselsenkung von 25,6%. Nach 2 Stunden 30 Min. bei normaler Atemfrequenz haben wir noch eine Senkung der Sauerstoffwerte von 24%. Im Gegensatz zum Äther, bei dem sich über Stunden ein ziemlich gleichmäßig gesenktes Niveau im Sauerstoffverbrauch einstellt, geht beim Evipan die Stoffwechselbeeinflussung bis zum Normalwert fast linear zurück. Es gilt also demnach für das Evipan die von Keys und Wells, Bijlsma und Lee u. a. gemachte Beobachtung nicht, daß dann nur eine Senkung durch die Barbiturate im respiratorischen Stoffwechsel eintritt, wenn die Atmung gestört oder geschädigt ist; wohl aber konnten wir diese Beobachtung für das nun zu besprechende Veronal und Luminal machen.

Veronal-Na.

Veronal und Luminal zeigen gegenüber den bisher besprochenen Mitteln einen ganz anderen Kurventyp ihrer Wirkung. Bei beiden laufen Senkung der Atemfrequenz und des Sauerstoffverbrauchs während der ganzen Versuchszeiten parallel (Abb. 6 und 7). Atmung und respiratorischer Stoffwechsel erreichten gleichzeitig nach 24 bzw. beim Luminal nach 72 Stunden die Ausgangswerte.

Das Veronal-Natrium wurde in einer Dosierung von 20 mg/100 g subkutan gegeben. Das sind 96 Mikromole. Nach einer Stunde haben Atmung und Sauerstoffverbrauch mit 56,5 und 48,5% ihre tiefsten Werte erreicht (Abb. 6). Es ist der Sauerstoffverbrauch praktisch im Verhältnis zur Atemfrequenz erniedrigt. Rein rechnerisch findet man einen Wert für den Sauerstoffverbrauch von 46,8%. Der Unterschied von 1,7% liegt in der Fehlerbreite, so daß man über die eigentliche Stoffwechselwirkung nach einer Stunde nichts Genaues aussagen kann. Bis zur 2. Stunde steigen Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch wieder an, um dann bis zur 5. Stunde auf diesem Niveau zu bleiben. Auch hier in diesem Kurventeil geht der Sauerstoffverbrauch parallel der Atemfrequenz. Wir finden empirisch von der 2. bis zur 5. Stunde die Werte von etwa —34,3% für den Sauerstoffverbrauch. Der rechnerische Wert beträgt 37,1%. Auch dieser Unterschied von 2,8% ist noch zu klein, um Endgültiges aussagen zu können. Es ist der Sauerstoffverbrauch bis auf 2,8% an den Sollwert heruntergegangen, so daß man feststellen könnte, daß bis zur 5. Stunde keine „echte" stoffwechselsenkende Wirkung durch das Veronal zu verzeichnen ist und die Einschränkung des respiratorischen Stoffwechsels lediglich auf der Abnahme der Atemtätigkeit beruht. Dies wäre demnach mit den Befunden von Keys und Wells, Bijsma,

LEE u. a. in Einklang zu bringen. Von der 5. bis 9. Stunde steigt der Sauerstoffverbrauch etwas stärker an, als er der Atemfrequenz entspräche, und zwar mit einem Unterschied bis zu 10%. Von der 9. Stunde ab finden wir wieder das alte Verhältnis mit einer Differenz von durchschnittlich 1,4%. Wenn man alle Daten des Sauerstoffverbrauchs von der 1. bis zur 11. Stunde betrachtet, so liegen alle Werte um eine Gerade, d. h. es steigt der respiratorische Stoffwechsel kontinuierlich von seinem tiefsten Punkte aus wieder an. Der Sauerstoffverbrauch nahm ungefähr entsprechend der Atemfrequenz ab bzw. wieder zu.

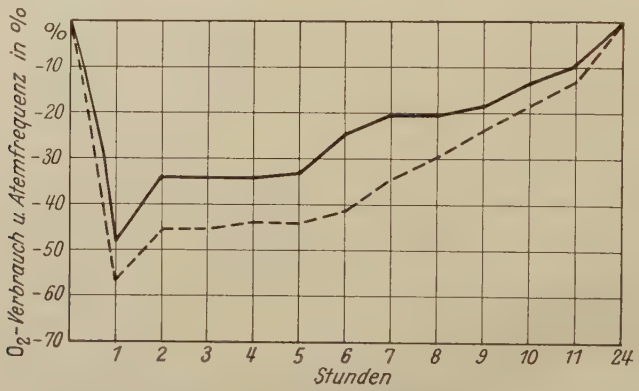


Abb. 6. Prozentuale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs ——— und der Atemfrequenz — — — durch die Einwirkung von 20 mg Veronal je 100 g bei der weißen Maus. Mittelwert von 3 Versuchen.

Diese direkte Wirkung auf das Atemzentrum wurde auch von LEHMANN[30] beschrieben, und zwar kommt es bei großen Dosen zur fortschreitenden Verminderung der Atmung bis zum Atemstillstand. In Analogie zu der oben beschriebenen geringen Beeinflussung des „reinen" respiratorischen Stoffwechsels durch Veronal stehen die Angaben von LÖWY[36], daß auch der Blutzucker durch Veronal im allgemeinen keine Veränderungen aufweist.

Luminal-Na.

Das Luminal wurde als sein Natriumsalz in einer Dosengröße von 10 mg auf 100 g = 39 Mikromole subkutan gegeben. Im Vergleich zu dem Veronal und Evipan wurde also die 0,4-fache bzw. die gleiche Dosierung genommen und dabei eine längere und stärkere stoffwechselsenkende Wirkung durch das Luminal gefunden. Im einzelnen beobachtete man folgendes (Abb. 7). Eine Stunde nach Injektion des Pharmakons haben Atmung und Sauerstoffverbrauch die Werte —49,3 und —41,4% erreicht. Bis zur 3. Stunde bleiben diese Daten mit geringen Schwankungen auf dem gleichen Niveau. Dabei entspricht die Senkung des respiratorischen Stoffwechsels wieder etwa der der

Atemfrequenz. So ergibt sich nach der 1. Stunde ein rechnerischer Wert von —41,8% gegenüber dem empirischen von —43,6% und nach

Abb. 7. Prozentuale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs ——— und der Atemfrequenz — — — durch die Einwirkung von 10 mg Luminal je 100 g bei der weißen Maus. Mittelwerte von 6 Versuchen.

der 3. Stunde —42,4% gegenüber dem experimentellen von —42,8%. Von nun an bis zur 5. Stunde fallen Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch weiter bis zu ihren tiefsten Werten von —66,6% und 56,6%. Auch jetzt ist noch immer der Sauerstoffverbrauch entsprechend der Atmung abgesunken (s. Tabelle 4). Von der 5. Stunde ab ändern sich nun die Verhältnisse. Atmung und respiratorischer Stoffwechsel steigen wieder an, aber erstere im Verhältnis zum Sauerstoff schneller, so daß nun eine „echte" Stoffwechselwirkung des Luminals festzustellen ist (Tabelle 4). Von der 1. bis 5. Stunde liegen die Differenzwerte alle um 0 bis —1,8%. Da nun, wie oben erwähnt, diese Werte in der Fehlergrenze liegen, sind sie nicht weiter zu verwerten, als daß man sagen

Tabelle 4. *Berechnung der reinen Stoffwechselwirkung (III) durch 10 mg/100 g Luminal-Na. Mittelwerte aus 6 Versuchen.*

Zeit in Stunden	O_2-Verbrauch in Prozent		III Differenz I—II Stoffwechsel in Prozent
	I empirischer Wert	II rechnerischer Wert	
1	— 43,6	41,8	— 1,8
2	— 41,3	41,3	+ 0,3
3	— 42,8	42,4	— 0,4
4	— 54,0	53,0	— 1,0
5	— 56,6	56,3	— 0,3
6	— 55,8	49,8	— 6,0
7	— 52,9	35,7	— 17,2
8	— 43,3	26,4	— 16,9
9	— 41,0	24,8	— 16,2
10	— 38,4	21,0	— 17,4
11	— 31,6	13,2	— 18,4
24	— 15,5	5,4	— 10,1
48	— 7,6	5,4	— 2,2
72	+ 0,9	0,0	+ 0,9

Tabelle 5. *Wirkung der einzelnen Narkotika bzw. Hypnotika auf den Stoffwechsel und die Atemfrequenz der weißen Maus.*

Pharmakon	Maximale Senkung des respiratorischen Stoffwechselwertes in %	Zeit in Min.	Dauer der Stoffwechselwirkung	Dauer der Atemfrequenzbeeinflussung
Chloralhydrat, 30 mg/100 g .	5,3	15	2 Stunden 45 Min.	2 Stunden 23 Min.
Chloralose, 4,3 mg/100 g . .	21,4	105	52 Stunden	5 Stunden 48 Min.
Äther, 0,0416 Vol.-% . . .	22,1	37	48 Stunden	2 Stunden
Evipan, 10 mg/100 g	25,0	20	24 Stunden	2 Stunden 30 Min.
Urethan, 100 mg/100 g . . .	26,7	23	1 Stunde 45 Min.	45 Min.
Veronal, 20 mg/100 g	0	0	0	24 Stunden
Luminal, 10 mg/100 g . . .	17,0	420	72 Stunden	72 Stunden

könnte, bis zur 5. Stunde liegt keine „echte" Stoffwechselsenkung vor und es ist der Sauerstoffverbrauch nur im Verhältnis zum Rückgang der Atmung vermindert worden. Dieser erste Kurventeil würde wieder mit den Angaben von KEYS und WELLS, BIJLSMA, LEE u. a. übereinstimmen. Von der 5. zur 6. Stunde kommt der Umschlagspunkt im respiratorischen Stoffwechsel und bis zur 11. Stunde finden wir eine fast kontinuierliche „echte" Senkung um etwa 17% (Tabelle 4). Nach 24 Stunden beträgt sie nur noch 10,1% und nach 48 Stunden —2,2%. Für das Luminal beobachtet man also erst von der 5. Stunde ab eine „echte" stoffwechselsenkende Wirkung, während die Atemfrequenz von Anfang bis zum Ende eine Dämpfung erfährt.

Besprechung.

Da die untersuchten Pharmaka in bekannten narkotischen bzw. hypnotischen Dosen angewandt wurden, ist es zulässig, die Versuche untereinander zu vergleichen. Nach den kurvenmäßigen Wirkungsbildern lassen sich zwei Typen deutlich herausstellen. Einmal Kurven, die nach dem „Äthertyp" verlaufen, und zweitens die beiden ziemlich analogen Bilder des Veronals und Luminals. Zum ersten Wirkungstyp gehört auch das Barbitursäurederivat Evipan. Das Gemeinsame des „Äthertyps" ist immer eine schnelle Erholung in bezug auf die Atemfrequenz, während beim Luminal und Veronal die Atmung nur langsam wieder zu den alten Werten ansteigt und der Sauerstoffverbrauch sich hierzu parallel verhält. Vergleicht man die tiefsten Werte der „reinen" Stoffwechselwirkung miteinander (Tabelle 5), so sehen wir, daß die Werte vom Äthertyp bis auf das

Chloralhydrat ziemlich alle in derselben Größenordnung liegen. Ebenso ist es mit der Zeit, in der diese Werte erreicht werden, mit Ausnahme der Chloralose. Ganz ander liegen die Verhältnisse beim Veronal und Luminal. Bei ersterem konnte keine „echte" Stoffwechselwirkung beobachtet werden, und bei letzterem trat diese erst in der 6. bis 7. Stunde mit durchschnittlich —17% auf. Zeitlich die kürzeste hemmende Wirkung auf den respiratorischen Stoffwechsel zeigen das Urethan mit 1 Stunde 45 Min. und das Chloralhydrat mit 2 Stunden 45 Min. (Tabelle 5). Beim Urethan fällt vor allem der sehr schnelle Rückgang der Stoffwechselbeeinflussung von —26,7% auf.

Es hat sich daher auch in anderweitigen Stoffwechselversuchen das Urethan gut bewährt, besnders dann, wenn operative Eingriffe am Organismus vorzunehmen sind. Wenn nach diesen lange genug zugewartet oder, was noch weit besser ist, am folgenden Tag erst der Stoffwechselversuch durchgeführt wird, dann kann mit Bestimmtheit eine Urethanwirkung auf den Stoffwechsel ausgeschlossen werden. Die gleichen Ergebnisse konnten wir auch für das Evipan finden.

Die verschiedene Wirkung der chemisch verwandten 3 Barbitursäurederivate läßt sich nach G. Orzechowski[37] und K. Klimesch[38] durch die Abhängigkeit der Wirkungsgeschwindigkeit von der Dissoziationsfähigkeit dieser Pharmaka erklären.

Wie wir sahen, besteht die Verminderung im Sauerstoffverbrauch bei den Narkoseversuchen aus 2 Komponenten. Die 1. hervorgerufen durch die Abnahme der Atemfrequenz, die durch die Narkotika zentral bedingt ist, und 2. durch eine reine stoffwechselsenkende Wirkung der Narkotika. Diese 2. Komponente kann man nach Beobachtungen von Winterstein[39], Kochmann[40], Heim[41], Heim und Fahr[42] und Heim und Rohde[43] folgendermaßen erklärt werden. Die genannten Autoren fanden, daß Narkotika einen entquellenden und permeabilitätsherabsetzenden Einfluß auf die Gewebe und die Zellgrenzflächenkolloide haben. Heim, Fahr und Rohde beobachteten eine Hemmung der Cholinesterase durch Narkotika. Beide Befunde sind nach der Straubschen Potentialtheorie, wie Gremels[44] ausgeführt hat, im Sinne eines stärkeren Wirkungseffektes des Vagusüberträgerstoffes Acetylcholin zu deuten. Mithin käme es zu einer Verschiebung der Stoffwechsellage des Organismus durch die Narkotika nach der vagotonen Seite. Nun sind aber, wie Gremels[45] weiter zeigen konnte, die vagotone Stoffwechselphase und eine Verminderung im Sauerstoffverbrauch zwei stets miteinander gleichsinnig gekoppelte Funktionen. Die beobachtete zweite Komponente, die Sauerstoffsenkung im respiratorischen Stoffwechsel wäre demnach als eine Verschiebung der Stoffwechsellage nach der vagotonen Seite hin zu deuten. Damit fänden wir auch hier eine pharmakologische Bestätigung der von Gremels[46] aufgefundenen vegetativ-hormonellen Stoffwechselsteuerung des Gesamtorganismus.

Zusammenfassung.

An weißen Mäusen wurde gleichzeitig Sauerstoffverbrauch und Atemfrequenz bestimmt. Es ergab sich, daß die Sauerstoffverbrauchsgröße in hohem Maße von der Atemfrequenz abhängig ist, und zwar besteht eine lineare Beziehung zwischen beiden Größen.

Der größte Teil des geatmeten Sauerstoffs wird bei der weißen Maus für die Atemtätigkeit benötigt. Innerhalb eines Frequenzbereiches von 340—180 Atemzügen/Min. sind es 88,10—81,0% des Gesamtsauerstoffverbrauchs. Bei Atemfrequenzen unter 180 ist der prozentuale Anteil erheblich geringer.

Es wurde weiterhin der Einfluß mehrerer Narkotika: Äther, Chloralose, Chloralhydrat, Urethan, Evipan-Na, Veronal-Na und Luminal-Na auf Sauerstoffverbrauch und Atemfrequenz untersucht. Der Sauerstoffverbrauch ist beim Urethan, Chloralhydrat, Evipan und Veronal über Stunden und beim Äther, Chloralose und Luminal über Tage gesenkt. Der hemmende Einfluß auf das Atemzentrum ist bei allen untersuchten Narkotika primär etwa gleich groß, jedoch von recht unterschiedlich zeitlicher Dauer.

Da nun 1. der Sauerstoffverbrauch bei großen Atemfrequenzunterschieden erhebliche Änderungen erfährt und 2. die untersuchten Narkosemittel die Atemfrequenz und den Sauerstoffverbrauch stark senken, ist es bei respiratorischen Stoffwechseluntersuchungen an weißen Mäusen unbedingt erforderlich, gleichzeitig Atemfrequenz und Sauerstoffverbrauch zu bestimmen und immer diese koordinierten Werte miteinander zu vergleichen. Durch diese Methode wird der Sauerstoffverbrauch für die Atemtätigkeit herauskompensiert und man kann so die prozentuale Veränderung im „reinen" Stoffwechsel berechnen.

Literatur.

[1] Schleinzer, R. u. J. Antal: Pflügers Arch. **245**, 361 (1941). — [2] Zit. nach M. Kochmann: In Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 1, S. 415. 1923. — [3] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **153**, 36 (1930); **162**, 29 (1931). — [4] Zit. nach M. Kochmann: In Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg.-Bd. II, S. 125. — [5] Bornsteim, A.: Dtsch. med. Wschr. **1930**, 1861. — [6] Siebert, W. J.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **29**, 650 (1932). — [7] Bernhardt, H. u. E. Bay: Z. klin. Med. **122**, 520 (1932). — [8] Groebbels, F.: Pflügers Arch. **208**, 601 (1925). — [9] Kahlson, G. u. M. Peil: Skand. Arch. Physiol. (D.) **78**, 117 (1938). — [10] Zit. Tabul. Biologicae **3**, 502 (1926). — [1] Liljestrand: Skand. Arch. Physiol. (D.) **35**, 199 (1918). — [12] Müller, E. A., H. Michaelis u. A. Müller: Arb.physiol. **112**, 193 (1942). — [13] Mansfeld, G. u. F. v. Tyukody: Arch. exper. Path. (D.) **176**, 87 (1934). — [14] Bierhaus, H.: Arch. klin. Chir. **189**, 438 (1940). — [15] Meyer, A. L.: J. Physiol. (Brit.) **48**, 47. — [16] Roroni, E.: J. biol. Chem. (Am.) **57**, 761 (1932). — [17] Nicloux, M.: Les Anesthétiques généraux. Paris 1908. — [18] Graméns, K.: Acta chir. Scand. (Schwd.) Suppl. **1** (1929). — [19] Henderson, Y.: Brit. med. J. **41** (1926). — [20] Griffith, F. R. jr., F. E. Emery and J. F. Lookood: Amer. J. Physiol. **131**, 561 (1941). — [21] Bijlsma, U. G.: Berichte über Staatl. Gesundheitsfürsorge in den Niederlanden 8, 1112 (1927). — Intern. Pharmakodynamie **35**, 13 (1928). — [22] Bornstein, A. u. K. Holm: Z. exper. Med. **53**, 451 (1926). — [23] Hoshi, T.: Tôhoku J. exper. Med. (Jap.) **19**, 196 (1932). — [24] Rabinowitsch, W.: Z. exper. Med. **66**, 284 (1929). — [25] Lidhard: J. Physiol. (Brit.) **42**, 337 (1911). —

[26] Wieland, H.: Arch. exper. Path. (D.) **79**, 95 (1915). — [27] Peng, D.: Arch. exper. Path. (D.) **151**, 270 (1930). — [28] Eckstein, A. u. E. Rominger: Arch. Kinderhk. **70**, 1 (1921). — [29] Yamano, K.: Mitt. med. Akad. Tokyo **2**, 156 (1928). — [30] Lehmann, A. J.: J. Pharmacol. (Am.) **65**, 235 (1935). — [31] Nowak, St. J.: Internat. Arch. Pharmacodynamie **60**, 118 (1938). — [32] Storm, C. J.: Internat. Arch. Pharmacodynamie **52**, 97 (1935). — [33] Keys, A. B. and N. A. Wells: J. Pharmacol. (Am.) **40**, 115 (1930). — [34] Lee, M. O.: Amer. J. Physiol. **85**, 388 (1932). — [35] Kleiber, M. and F. J. Sanders: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.) **36**, 377 (1937). — [36] Löwy, J.: Zbl. inn. Med. **42**, 713 (1921). — [37] Orzechowski, G.: Schmerz usw. **9**, 185 (1937). — [38] Klimesch, K.: Arch. exper. Path. (D.) **172**, 10 (1933). — [39] Winterstein: Biochem. Z. **75**, 71 (1916). — [40] Kochmann, M.: Biochem. Z. **136**, 49 (1923). — [41] Heim, F.: Arch. exper. Path. (D.) **191**, 212 (1938); **192**, 1 (1939). — [42] Heim, F. u. A. Fahr: Arch. exper. Path. (D.) **195**, 59 (1940). — [43] Heim, F. u. W. Rohde: Arch. exper. Path. (D.) **202**, 215 (1943). — [44] Gremels, H.: Erg. Physiol. **42**, 53 (1939). — [45] Gremels, H.: Arch. exper. Path. (D.) **182**, 1 (1936); **186**, 625 (1937); **188**, 71 (1937). — [46] Gremels, H.: Klin. Wschr. **1947**, 449.

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lavès).

Histamin und weibliches Genitale.

Von

Steffen P. Berg.

(Eingegangen am 27. Juli 1948.)

Im Verlauf von Untersuchungen * zur Differenzierung verschiedener Körpersekrete in forensischen Fällen stießen wir auf eine biologisch aktive Substanz im Vaginalsekret des Weibes, welche sich bei der Prüfung zahlreicher Sekretabstriche konstant nachweisen ließ. Da dieser Befund unter Umständen für die Physiopathologie des weiblichen Genitales von Interesse sein konnte, wurde versucht, über die Natur und eventuelle Bedeutung dieser Substanz nähere Kenntnisse zu gewinnen. Über unsere diesbezüglichen Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

Es hatte sich gezeigt, daß Auflösungen von Vaginalsekret in Tyrodelösung am isolierten überlebenden Meerschweinchendarm nach Magnus kontraktionsauslösend wirken. Da zunächst eine Reaktion des Darmes auf Änderung der H-Ionenkonzentration (Milchsäure!), etwa im Sinne einer Cholinesterbildung, auszuschließen war, erfolgte Verarbeitung des Materials zu neutralen isotonischen Extrakten; diese besaßen jedoch unveränderte Wirksamkeit. Übrigens erwies sich auch eine den Verhältnissen des Vaginalsekretes angepaßte Milchsäurekonzentration am gleichen Objekt als indifferent bzw. höchstens leicht tonussenkend.

Für den Fall, daß es sich bei der zu untersuchenden Substanz überhaupt um einen einheitlichen Körper handeln würde, ließen die Berichte verschiedener Autoren über den Nachweis von H-Substanzen in anderen Körpersekreten und -flüssigkeiten zunächst daran denken, daß auch in unserem Fall ein derartiger Stoff die beobachtete Wirkung hervorrufe. In dieser Reihe pharmakologisch ähnlich wirkender Körper aus Organextrakten und Drüsensekreten, wie Vesiglandin (v. Euler[1]), Prostaglandin (Goldblatt[2]), den Wirkstoffen des Speichels (Secker, Feldberg und Guimarais[3]), steht die von v. Euler und Gaddum[4] aus Gehirn und Dünndarm isolierte Substanz „P" an erster Stelle.

* Fräulein cand. med. L. Münzhuber danke ich für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche, den Herren Dr. Klebanoff, Dr. Mayr und Dr. Wagner von der I. Univ.-Frauenklinik München für weitgehende Unterstützung bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials.

Dieser im Organismus offenbar ziemlich ubiquitäre Körper, der nach den Untersuchungen von Weissbecker[5] auch eine wesentliche Komponente des Freundschen Spätgiftes im Blut zu sein scheint, ist in seiner Wirkung dem Histamin sehr ähnlich; nach v. Euler[6] dürfte es sich um eine Albumose handeln. Extrakte, welche Substanz „P" enthalten, bewirken Kontraktion des Meerschweinchen- und Mäusedarmes, ferner Blutdrucksenkung und am Gefäßpräparat Verengerung; die Darm- und Blutdruckwirkung ist atropinfest, die Gefäßwirkung wird durch Ergotamin abgeschwächt. Im Gegensatz zu Histamin verhält sich der virginelle Meerschweinchenuterus gegenüber Substanz P refraktär. Durch Trypsinverdauung, sowie Kochen des Extraktes in Alkali wird die Darm- und Blutdruckwirkung aufgehoben, während Desaminierung einen nur unwesentlichen Wirkungsverlust verursacht.

Im folgenden wurden zunächst mit dem von Weissbecker[5] modifizierten Verfahren von v. Euler und Gaddum[4] gewonnene Extrakte in Form neutraler isotonischer Lösungen des Alkoholrückstandes zur Testung verwendet. Diese Extrakte zeigten im Vergleich zu den Ausgangslösungen eine Wirkung von 80 bis 90%, was nach den Erfahrungen Weissbeckers bereits gegen das Vorliegen der Substanz P sprach. Die Darmwirksamkeit auch unserer Substanz erwies sich in zahlreichen Versuchen als kochresistent und atropinfest; dagegen konnte mit den gleichen Dosen, welche am Meerschweinchendarm noch eine starke Kontraktion bewirkten, am Mäusedarm keine deutliche Reaktion erzielt werden. Der Blutdruck der narkotisierten, atropinisierten Katze wurde durch Injektion von 0,1 cm³ der etwa 0,01 cm³ Nativsekret entsprechenden Extraktverdünnung gesenkt. Der virginelle Meerschweinchenuterus zeigte bei Einwirkung geringer Extraktmengen stets lebhafte Kontraktion, welche durch Zusatz von Atropin nicht abgeschwächt wurde.

Die gleichen Wirkungen konnten auch mit Lösungen erzielt werden, welche nach dem Vorgang Weissbeckers durch Extraktion von Vaginalsekret-Dialysaten hergestellt waren (24stündige Dialyse der wäßrigen Sekretlösung gegen Aqua dest. bei dreimaliger Erneuerung der Außenflüssigkeit, Eindampfen der vereinigten Dialysate, Aufnahme des Rückstandes in Methylalkohol und Lösung des Alkoholrückstandes in Tyrode; Wirkungsverlust etwa 40%). Um die Substanz P, deren Vorliegen nun bereits ziemlich unwahrscheinlich geworden war, endgültig auszuschließen, wurden einige derartige Extrakte der peptischen Verdauung unterworfen. Da unsere Trypsinpräparate im Leerversuch stets eine erhebliche Eigenwirkung am Darm zeigten, wurde statt Pankreatin Papayotinum Merck verwendet: Eine selbst 12stündige Verdauung mit 10 mg Papain/cm³ Extrakt bei 37° verursachte in keinem Fall eine nennenswerte Abschwächung der Darmwirksamkeit.

Wir hatten demnach eine Substanz vor uns, welche keinesfalls Eiweißnatur besitzen konnte, und als alkohollöslich, kochbeständig, dialysabel, atropinfest, erregend auf glattmuskuläre Organe und blutdrucksenkend zu bezeichnen war. Somit war nur noch an einen pharmakologisch differenten Körper aus der Gruppe der biogenen Amine zu denken, und zwar in erster Linie an Histamin.

Zur weiteren Identifizierung wurden nun die Extrakte nach dem Verfahren von BARSOUM und GADDUM[7] hergestellt (welches sich von dem zuvor genannten im wesentlichen nur durch die Behandlung des Materials mit Trichloressigsäure unterscheidet); bei der Testung dieser Extrakte zeigte sich ungefähr die gleiche Intensität pharmakologischer Wirksamkeit wie zuvor. Die Extrakte gaben bei Anstellung der PAULYschen Reaktion den charakteristischen roten Farbton, wenn auch in schwacher Intensität. Dieser Umstand kann zwar nicht als beweisend für Histamin angesehen werden, da außer Histamin u. a. auch Histidin, Tyrosin und Tyramin die gleiche Reaktion geben; jedoch hätten sich Histidin und Tyrosin am Darm indifferent, Tyramin aber blutdrucksteigernd verhalten müssen.

Durch Desaminierung wurde die Wirksamkeit der Extrakte nahezu vollständig aufgehoben (dies würde z. B. für Substanz P nicht zutreffen, ist aber für biogene Amine charakteristisch). Auch sonst verhielt sich unsere Substanz bei Vergleichstestungen gegen ein Standardpräparat (Imido Roche) genau wie Histamin. Die Darmwirkung der Extrakte wurde durch Ergotamin gehemmt.

Durch Zusatz von Antistin in einer Konzentration von 10^{-7} (welches uns gütigerweise durch Herrn Prof. WERLE zur Verfügung gestellt wurde) zur Badflüssigkeit konnte die Darmwirkung völlig unterdrückt werden. Der Antagonismus der neuen Antihistaminkörper erstreckt sich allerdings nach MEIER und BUCHER[8] bezüglich der Meerschweinchendarmkontraktion auch auf die Wirkung von Azetylcholin und $BaCl_2$; ersteres war im vorliegenden Fall jedoch durch die Atropinresistenz der Wirkung, letzteres durch das Extraktionsverfahren auszuschließen.

Nach dem Vorgang von WERLE[9] konnte schließlich die Beweiskette für die Identität unserer Substanz mit Histamin noch durch folgende Versuche geschlossen werden:

1. Identifizierungsreaktion nach EDLBACHER[10]. Wurde der Badflüssigkeit eine molekulare Argininkonzentration zugesetzt, so blieb das Präparat gegenüber unseren Extrakten ebenso refraktär wie gegenüber Standardhistamin.

2. Durch Behandlung der Extrakte mit einem Diaminoxydasepräparat (Torantil Bayer) durch 2 Stunden im WARBURGschen Schütteltherm ostaten bei 37° verschwand jede pharmakologische Aktivität. Eigene Versuche zeigten, daß Substanz P durch Histaminase nicht abgebaut wird. Bekanntlich reagiert Diaminoxydase außer mit Histamin auch noch mit anderen Diaminen, wie Cadaverin und Putreszin, sowie mit Spermin, Spermidin und Agmatin (ZELLER[11]); diese konnten jedoch ihrer pharmakologischen Inaktivität zufolge hier außer Betracht gelassen werden.

3. Die gleiche Extraktdosis, welche an der narkotisierten Katze eine deutliche Blutdrucksenkung hervorrief, blieb beim Kaninchen ohne Wirkung bzw. zeitigte hier leichte Blutdrucksteigerung.

Den geschilderten Ergebnissen zufolge konnte die Gegenwart von Histamin im Vaginalsekret als gesichert angesehen werden. Nächst dem qualitativen Nachweis wurde nun versucht, den Histamingehalt verschiedener Sekrete quantitativ zu bestimmen. Zur Messung der Histaminkonzentration diente die Testung am Meerschweinchendarm im Vergleich zu Standardhistaminlösungen in der von WERLE[12] angegebenen Anordnung. Die auf diese Weise für 0,1 g Vaginalsekret gesunder geschlechtsreifer Frauen errechneten Histaminwerte schwankten zwischen 3 und 6 γ.

Über die *Herkunft* dieses Vaginalsekret-Histamins waren verschiedene Vorstellungen möglich. Bekanntlich besteht hinsichtlich der Natur des Scheideninhaltes noch keine einheitliche Auffassung. Verschiedene Autoren betrachten denselben nicht eigentlich als Sekret, sondern eher als ein „Transsudat mit Beimischungen" (Skutsch[13].) Nach Döderlein[14] ist der Scheideninhalt unter Umständen doch mit Recht als Sekret zu bezeichnen, weil das Vaginalepithel in seiner Gesamtheit sozusagen als holokrine Drüse aufgefaßt werden kann. Schröder, Hinrichs und Kessler[15] sehen die Vaginalflüssigkeit im Gegensatz zu der Transsudattheorie als das Autolysat desquamierter Epithelien an. Abgesehen davon, daß die Transsudattheorie noch umstritten ist (die Ausscheidung humoral gelöster Substanzen in die Vagina wurde zwar durch Nürnberger[16] erwiesen), erscheint die Annahme, daß das Histamin auf diese Weise in die Vagina gelange, doch recht unwahrscheinlich: Der gefundene Histamingehalt des Vaginalsekretes übertrifft den Blutspiegel um das rund 1000fache; demnach müßte außer der Abscheidung durch die Vaginalwand noch eine enorme Konzentrationsfähigkeit angenommen werden.

Ein weiterer Modus der Histaminbildung wäre in der Annahme einer dekarboxylierenden Funktion der angrenzenden Gewebe gegeben. Die Möglichkeit einer Histaminbildung in tierischen Geweben durch Dekarboxylierung von Histidin wurde von Bloch und Pinösch[17] vermutet, durch Werle und Holtz[18] bewiesen. Die hierfür verantwortliche Histidindekarboxylase fand Werle[19] in verschiedenen Organen (Niere, Leber, Dünndarm) von Meerschweinchen und Kaninchen; für andere Tierarten, auch für den Menschen, konnte das Ferment jedoch nicht sicher nachgewiesen werden. Eigene orientierende Versuche in dieser Hinsicht lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, da bezüglich der Sterilität des Materials (Gewebe aus Vaginalwand und Zervixschleimhaut) die erforderliche Sicherheit nicht gegeben erschien.

Am wahrscheinlichsten ist wohl die Annahme einer Histaminbildung durch autolytische Vorgänge bzw. durch Bakteriendekarboxylase. Es ist bekannt, daß die verschiedensten Bakterienstämme aus Histidin Histamin bilden können; in erster Linie kommen hier allerdings (Koessler und Hanke[20], Werle[21], Ehrismann und Werle[34]) die Stämme der Coli-Typhoidgruppe in Betracht. Für die Vaginalflora fehlen bislang diesbezügliche Erfahrungen; jedoch scheinen die Voraussetzungen für eine histidin-dekarboxylierende Tätigkeit der (anoxybiotischen) Scheidenbakterien grundsätzlich gegeben. So würde z. B. die saure Reaktion des Vaginalsekretes mit dem Wirkungsoptimum der Aminosäuredekarboxylasen zusammenfallen. Ferner ist die Gegenwart von Albumosen und Peptonen, sowie von Aminosäuren (Tyrosin und Histidin!) in der Vaginalflüssigkeit erwiesen

(Raab[22]). In eigenen Versuchen wurde nun geprüft, ob der Scheideninhalt des Weibes zur Bildung von Histamin aus Histidin befähigt ist; dabei wurde von einer Elektivzüchtung einzelner Bakterienstämme (z. B. der Döderleinschen Vaginalbazillen) abgesehen, weil unter physiologischen Verhältnissen eine bakterielle Dekarboxylierung doch nicht von einer Histaminbildung durch körpereigene Fermente desquamierter Epithelien zu trennen wäre. Die Bestimmung der Dekarboxylaseaktivität erfolgte nach dem von Werle[23] angegebenen Verfahren. Unter aseptischen Kautelen entnommene Scheidenflüssigkeit wurde in 2 Ansätzen mit Putreszintyrode, deren einem 10 mg l-Histidin zugesetzt waren, bei 38° 2 Stunden geschüttelt. Die Messung des gebildeten Histamins erfolgte am isolierten Meerschweinchendünndarm. Es zeigte sich jeweils im Histidinansatz eine beträchtliche Steigerung der darmkontrahierenden Wirkung.

Die Frage nach der *Bedeutung*, welche dem Histamingehalt des Vaginalsekretes zukommen könnte, vermag recht weitgefaßte Überlegungen auszulösen. Entsprechend den verschiedenen Funktionen des Vaginalschlauches können auch seinem Inhalt unterschiedliche Aufgaben zugesprochen werden.

Nach Sellheim ist die Scheide 1. Sameneinführungsgang, 2. Eiausführungsgang und 3. Sekretausführungsgang.

Eine in jedem Fall bedeutungsvolle Funktion des Scheideninhaltes ist nach Döderlein der Selbstreinigungsmechanismus, die Verhinderung einer aufsteigenden Infektion des Genitalkanales.

1. Der hohe Gehalt des Spermas an Diaminoxydase[24], dessen Bedeutung bislang ungeklärt ist, läßt daran denken, daß in dem Histamin des Vaginalsekretes das gesuchte Substrat dieser sicher nicht zufälligen Fermentkonzentration gefunden ist. Es war zunächst denkbar, daß Histamin die Spermatozoenbeweglichkeit hemmt und den Spermatozoen aus diesem Grunde eine hochaktive Histaminase beigegeben wäre. Ein orientierender Versuch belehrte uns jedoch, daß Histamin selbst in hohen Konzentrationen auf die Spermatozoenbewegung ohne Einfluß ist. Das beweist aber nicht, daß die Kombination: Vaginalsekrethistamin — Spermahistaminase für das Spermatozoon gleichgültig ist; der Wirkungsmechanismus kann wesentlich komplizierter sein. Einerseits legen z. B. die Erfahrungen amerikanischer Autoren über die Bedeutung der Abbausubstanzen der Mukopolysaccharase-Substrat-Reaktion für die Spermatozoenbewegung den Analogieschluß nahe, daß auch die bei der Diamin-Diaminoxydasereaktion freiwerdenden Spaltprodukte für das Spermatozoon von Wichtigkeit sein könnten. Andererseits wäre, wiederum analog zu den Aufgaben der Spermahyaluronidase, für das Eindringen der Spermatozoen in die höheren Geschlechtswege[25] die Vermutung möglich, daß die Aufgaben der Spermahistaminase in einer ähnlichen Richtung liegen: Macht man für

den Tonus des Zervikalkanales etwa den Histamingehalt der Gebärmutter[9] verantwortlich, so wäre die Annahme, daß die Histaminaseaktivität des Ejakulates zu dessen Lockerung beitragen und damit ein leichteres Eindringen der Spermatozoen in den Uterus ermöglichen könnte, nicht allzu unwahrscheinlich.

2. Während der Schwangerschaft erfolgt bekanntlich eine weitgehende Lockerung im Tonus des Vaginalschlauches. Da aber Werle und Effkemann[26], sowie Zeller und Birkhäuser[27] ein starkes Ansteigen des Histaminase-Blutspiegels während der Gravidität feststellten, und Berg[28] ein analoges Verhalten der Diaminoxydasewerte auch im Vaginalsekret Schwangerer nachweisen konnte, schien die Annahme möglich, daß dem Histamin ganz allgemein ein tonisierender Einfluß auf die Wandmuskulatur des Genitalschlauches zukomme. Effkemann und Werle[9] untersuchten den Histamingehalt der graviden und nichtgraviden Gebärmutter. Sie fanden für den nichtschwangeren Uterus je Gramm Gewebe Werte von 5—30 γ, welche für den schwangeren Uterus deutlich niedriger (4—7 γ) lagen. (Für das Gesamtgewicht berechnet, ergab sich natürlich infolge der vielfachen Massenzunahme des Uterus der 5—10fache Wert der nichtgraviden Gebärmutter.) Hierin erblicken Effkemann und Werle eine gestative Mehrbildung von Histamin, welche sie auf einen erhöhten Histidinstoffwechsel der Schwangeren zurückführen. Die möglichen Aufgaben des Histamins im weiblichen Genitale sehen die genannten Autoren 1. in einer anpassungs-regulativen Wirkung auf die örtlichen Kreislaufverhältnisse, 2. in einer Permeabilitätssteigerung der Kapillaren, deren Folge die bekannte sukkulente Auflockerung des Gewebes in der Gravidität sei; schließlich vermuten sie 3. eine Bedeutung des Histamins für die Wehentätigkeit.

Die von Effkemann und Werle als Folge einer Histaminwirkung aufgefaßte gestative Durchblutungs- und Durchsaftungsänderung der Genitalien wird allerdings von Reynolds[29] auf andere Weise erklärt. Nach dessen Untersuchungen erhöht sich nach Zufuhr von Follikelhormon der Acetylcholingehalt des nichtschwangeren Uterus; die durch das Hormon hervorgerufene Mehrbildung von Acetylcholin bewirke eine stärkere Durchblutung der Sexualorgane und schaffe so die für Wachstum und Entwicklung notwendigen Voraussetzungen.

Die Aufgaben der vermehrten Histaminaseaktivität schließlich werden in einer Schutzfunktion gegenüber unerwünschten Kreislaufwirkungen etwa ausgeschwemmter Histaminquantitäten gesehen.

Von einem Einfluß des Histamins auf die glatte Muskulatur ist hier nicht die Rede; jedoch wäre es unseres Erachtens nicht ganz ausgeschlossen, daß die für den graviden Uterus typische Detonisierung nicht nur auf eine Auflockerung des Gewebes, sondern auch auf die

nachgewiesene relative Verminderung des Gewebshistamins infolge Steigerung des Histaminasespiegels während der Gravidität zurückzuführen ist. EFFKEMANN und WERLE schließen aus der Erhöhung der für das Gebärmutter-Gesamtgewicht berechneten Histaminmenge auf eine Steigerung der Histaminwirkungen auf die einzelne Zelle. Es möchte uns aber fast folgerichtiger erscheinen, nicht den auf das Gesamtgewicht berechneten Absolutwert, sondern gerade den je Gramm Gewebe gefundenen Relativwert als den für biologische Auswirkungen auf das Zellgeschehen Wichtigeren zu betrachten. Und dieser Wert liegt nach EFFKEMANN und WERLE für den graviden Uterus niedriger als für den nichtgraviden. Von diesem Standpunkt aus könnte man das Verhalten des Gebärmuttertonus während der Gravidität schließlich als Beweis für einen hypothetischen Einfluß des Histamins auf die Tonuslage des Uterus anführen, und eine Aufgabe der gestativen Histaminasevermehrung in der physiologisch notwendigen Detonisierung des Fruchthalters erblicken. Gegen eine Überbewertung der Bedeutung des Histamins für die gestative Weiterstellung sprechen allerdings die anatomischen Tatsachen: Nach NÜRNBERGER[16] erfolgt die Erweiterung der unteren Geschlechtswege während der Gravidität im wesentlichen durch automatisch-synergistisches Wachstum der Elemente der Vaginalwandung synchron und synergetisch mit dem Wachstum des Eies, des Fruchthalters und der Bauchdecken (aktive Weiterstellung nach SELLHEIM).

Über den Histamingehalt des Vaginalsekretes bei Nichtschwangeren und Schwangeren gibt die Tabelle 1 Auskunft, welche die Mittelwerte quantitativer Bestimmungen nach der oben angegebenen Methode in je 3—4 Fällen enthält.

Tabelle 1.

Gravidität Mens	γ Histamin/0,1 g Vaginalsekret
—	6,0
—	3,4
—	5,8
II	4,0
III—IV	3,6
IV	2,0
IV	2,2
V	0,8
VI	2,4
VII	2,6
VIII	5,8
IX	3,0
X	4,4

Die Werte liegen offensichtlich während der Schwangerschaft niedriger als in der Norm, was mit dem entgegengesetzt proportionalen Verhalten der Diaminoxydaseaktivität während der Gravidität in gutem Einklang steht. Merkwürdigerweise erreichen aber die für die letzten Monate bestimmten Zahlen wieder das Niveau des nichtgraviden Zustandes; die Zahl der Bestimmungen ist jedoch zu gering, als daß hieraus besondere Rückschlüsse gezogen werden könnten.

3. Eine Bedeutung des Vaginalsekrethistamins für den Selbstreinigungsmechanismus des Scheideninhaltes zu erörtern, schien zunächst gegenstandslos, da bakteriostatische Wirkungen des Histamins nicht bekannt waren, und zudem nach WERLE[30] nahezu alle Bakterien in

Gegenwart von Histamin in Kürze die Fähigkeit zur Oxydation oder dehydrierenden Desaminierung entwickeln würden. Eine Mitteilung von Jancsó[31] aus neuester Zeit über die Eigenschaften des Histamins als Aktivator physiologischer Abwehrvorgänge läßt jedoch die Überlegung, daß das Histamin auch für die Abwehrfunktion des Vaginalsekretes von Bedeutung sein könnte, in einem neuen Licht erscheinen. Jancsó stellte fest, daß Histamin die Umwandlung ruhender Endothelzellen in aktive Phagozyten katalysiert. An Versuchstieren wurde durch Antistingaben die phagozytische Aktivität retikuloendothelialer Zellen gehemmt. Über den Wirkungsmechanismus entwickelt Jancsó die Anschauung, daß eine bestimmte Molekülgruppe des Zellplasmas mit dem Histaminmolekül in Verbindung treten müsse, damit die Zelle eine phagozytische Tätigkeit entfalten könne; in dieser Verbindung könne das ähnlich strukturierte Antistin nach dem Massenwirkungsgesetz mit Histamin in Konkurrenz treten bzw. es verdrängen. Das Histamin habe somit als Wirkgruppe eine wichtige Aufgabe bei den Verteidigungs- und Genesungsvorgängen des Organismus zu erfüllen: das Freiwerden des latenten Histamins in den Geweben durch verschiedene physikalische und chemische Einflüsse, z. B. bei der Entzündung, diene an den verletzten Stellen des Organismus der Erzeugung einer aktiven retikuloendothelialen Zone.

Nach der herrschenden Ansicht spielt der bakteriostatische Effekt der von den Döderleinschen Vaginalbazillen erzeugten Milchsäure eine wichtige, aber nicht allein ausschlaggebende Rolle bei der Selbstreinigung der Scheide. Nach Menge[32] und Zöppritz[35] wirkt auch alkalisches Vaginalsekret bakterizid. Wenn sich die vorstehend angeführten Ergebnisse Jancsós bestätigen ließen, so wäre jedenfalls mit der Möglichkeit einer abwehrkatalytischen Aufgabe des Histamins auch in der Scheide zu rechnen.

In dieser Richtung unternommene orientierende Bestimmungen des Histamingehaltes des Vaginalsekretes bei Fluor vaginalis ergaben in einer Reihe von Fällen gegenüber der Norm erniedrigte Werte, teilweise sogar völliges Fehlen des Histamins. Die Ursache dieser Befunde könnte in der von Döderlein nachgewiesenen Aziditätsabnahme in pathologischen Vaginalsekreten liegen, da die Tätigkeit von Histidindekarboxylase im neutralen bzw. alkalischen Milieu beeinträchtigt ist. Bevor hier jedoch an etwaige therapeutische Konsequenzen gedacht werden kann, wären wohl noch eingehendere Untersuchungen an einem größeren Material erforderlich.

Zusammenfassung.

Es wird über den *Nachweis* einer pharmakologisch aktiven Substanz im Vaginalsekret berichtet, welche nach eingehender Prüfung als Histamin identifiziert werden konnte.

Bezüglich der *Herkunft* dieses Vaginalsekrethistamins wird die Anschauung vertreten, daß für die Histaminbildung wahrscheinlich ein Zusammenwirken autolytisch-fermentativer Vorgänge bei der Epitheldesquamation mit Histidindekarboxylase der Vaginalbakterien von ursächlicher Bedeutung ist.

Über die *Aufgaben* des Histamins in der Scheidenflüssigkeit sind verschiedene Vorstellungen möglich. Es wird zunächst die Möglichkeit diskutiert, daß das System: Spermahistaminase — Vaginalsekrethistamin im Rahmen der Befruchtungsvorgänge von Bedeutung sein könnte. Weiterhin wird die Auffassung vertreten, daß die Korrelationen im Histamin-Histaminase-Haushalt des Organismus während der Gravidität auf eine tonisierende Funktion des genitalen Gewebshistamins hinweisen. Schließlich wird die Möglichkeit einer abwehrkatalytischen Aufgabe des Vaginalsekrethistamins innerhalb des Selbstreinigungsmechanismus der Scheide erörtert.

Literatur.

[1] Euler, v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **175**, 78. — [2] Goldblatt: Zit. nach 5. — [3] Secker, Feldberg u. Guimarais: Zit. nach 5. — [4] Euler, v. u. Gaddum: J. Physiol. (Brit.) **72**, 74 (1931). — [5] Weissbecker: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **204**, 674 (1947). — [6] Euler, v.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **181**, 181 (1936). — [7] Barsoum u. Gaddum: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig: Georg Thieme 1939. — [8] Meier u. Bucher: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 294. — [9] Effkemann u. Werle: Arch. Gynäk. **170**, 173 (1940). — [10] Edlbacher: Zit. nach 9. — [11] Zeller: Helvet. chim. Acta **21**, 880 (1938). — [12] Werle u. Herrmann: Biochem. Z. **291**, 105 (1937). — [13] Skutsch: Arch. Gynäk. **125**, 455. — [14] Döderlein: Handbuch der Geburtshilfe, Bd. 3, S. 303. — [15] Schröder, Hinrichs u. Kessler: Zit. nach 16. — [16] Nürnberger: In Stoeckels Handbuch der Gynäkologie, Bd. V, S. 2. München: J. F. Bergmann 1930. — [17] Bloch u. Pinösch: Z. physiol. Chem. **239**, 236 (1936). — [18] Holtz: Erg. Physiol. **44**, 230 (1941). — [19] Werle u. Krautzun: Biochem. Z. **296**, 315 (1938). — [20] Koessler and Hanke: J. biol. Chem. (Am.) **50**, 131 (1922); **59**, 835, 855, 867 (1924). — [21] Werle: Biochem. Z. **309**, 61 (1941). — [22] Raab: Zit. nach 16. — [23] Werle: Biochem. Z. **311**, 270 (1942). — [24] Zeller: Helvet. chim. Acta **24**, 117 (1940). — [25] Kurzrock and Miller: Amer. J. Obstetr. **15**, 56 (1928); **24**, 19 (1932). — [26] Werle u. Effkemann: Arch. Gynäk. **170**, 82 (1940). — [27] Zeller u. Birkhäuser: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 975. — [28] Berg: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **39**, 89 (1948). — [29] Reynolds: J. Physiol. (Brit.) **95**, 258 (1939). — Amer. J. Physiol. **127**, 343 (1939). — [30] Werle: Biochem. Z. **309**, 61 (1941). — [31] Jancsó: Nature (Brit.) **1947**. — Ber. Physiol. usw. **126**, 475 (1941). — [32] Menge: In Menge-Krönigs Bakteriologie des weiblichen Genitalkanals, Bd. II. 1897. — [33] Zöppritz: Mschr. Geburtsh. **33**, 276. — [34] Ehrismann u. Werle: Biochem. Z. **318**, 560 (1948).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Greifswald.

Zur Frage eines renalen Angriffspunktes des Insulins*.

Von

Günther Vogel.

(Eingegangen am 11. Oktober 1948.)

Nach den heute weitgehend anerkannten Ansichten der Filtrations-Reabsorptionstheorie der Harnbereitung wären die im Glomerulusfiltrat gelösten Stoffe in gleicher Konzentration wie im Plasma vorhanden. Eine Ausnahme würden nur die hochmolekularen Eiweißstoffe bilden, die durch die Glomeruluswand normalerweise nicht hindurchtreten. Mit dieser Theorie lassen sich, wie es scheint, viele bisherige Erfahrungen an Säugetieren, im grundsätzlichen aber auch an den Amphibien, deren Untersuchung wir wesentliche Stützen moderner Anschauungen über die Betätigungsart der Niere verdanken, im großen und ganzen in Einklang bringen.

Durch Rückresorption würde die große Menge provisorischen Harns erheblich reduziert, beim Menschen bis auf unter 1% der Ausgangsmenge, wobei die dem Körper dienlichen Stoffe dem Blut wieder zugeführt, während toxisch wirkende Stoffwechselendprodukte im endgültigen Harn eliminiert werden. Eine Substanz, die beim Gesunden wohl im provisorischen, aber nicht im endgültigen Harn erscheint, ist der Traubenzucker, der bis auf einen verschwindenden Rest in den Tubuli wieder rückresorbiert wird und damit dem Energiehaushalt des Körpers erhalten bleibt.

Wie wichtig diese Verhältnisse sind, wird klar, wenn man sich die größenmäßige Bedeutung dieser Vorgänge vor Augen führt: In 170 Liter menschlichen Vorharns (das ist die Vorharnproduktion 1 Tages) wären 170 g Glukose enthalten, diese wiederum repräsentieren einen energetischen Wert von rund 680 kcal, was ungefähr einer Energiemenge entspricht, mit der ein erwachsener Mensch etwa 8—9 Stunden seinen Grundumsatz decken kann. Die Rückresorption von Glukose ist somit für den Körper ein außerordentlich zweckmäßiger Vorgang.

Bei der Glykosurie wird im Harn Zucker ausgeschieden, und man kann von vornherein nichts darüber aussagen, ob das Auftreten von Zucker im Harn zurückzuführen ist auf eine Störung der Glukose-

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Zentralverwaltung für das Gesundheitswesen in der sowjetisch besetzten Zone durchgeführt, wofür ich an dieser Stelle meinen Dank ausspreche. Durch Mithilfe bei den Versuchen hat mich Herr cand. med. Adolf Drews in dankenswerter Weise unterstützt.

rückresorption, oder ob vielleicht die Glukosekonzentration des Vorharns (= Plasmas) so hoch ist, daß bei einer begrenzten Resorptionskapazität der Tubuli nicht sämtlicher Zucker rückresorbiert werden kann, oder ob der Vorharn die Tubuli zu schnell passiert, so daß die resorptorischen Epithelien deswegen ihre Aufgabe nicht erfüllen können. Um den Zuckergehalt des Blutes (und damit des Vorharns) in ein bestimmtes Verhältnis zu dem des Harns zu setzen, wurde der Begriff der Nierenschwelle (für einen bestimmten Stoff) eingeführt, der etwas darüber aussagt, bei welcher Konzentration von Zucker im Blut Dextrose im Harn erscheint bzw. daraus verschwindet. Ist das Auftreten von Zucker im Urin eine einfache Funktion der Höhe des Blutzuckers, oder ist die Niere selbst mit ihrem komplizierten Filtrations-Rückresorptionsmechanismus maßgeblich an der Festlegung der „Nierenschwelle" und des Verhältnisses von Blutzucker : Harnzucker beteiligt? Diese Frage gewinnt im Lichte der Diabetesforschung eine besondere Bedeutung, wobei der Begriff des Diabetes in der vorliegenden Untersuchung auf den Begriff des Insulinmangeldiabetes eingeengt werden soll. Die Problemstellung erscheint dann in folgender Fassung: Ist die Glykosurie beim Diabetes allein eine Folge der durch Insulinmangel hervorgerufenen Hyperglykämie, oder wird die Glykosurie noch verstärkt oder gefördert dadurch, daß infolge des Insulinmangels eine Hemmung der Glukoserückresorption eintritt, mit anderen Worten: Gibt es einen (schon mehrfach behaupteten) renalen Angriffspunkt des Insulins? Diese Frage erscheint nach den bisherigen Erkenntnissen keineswegs abwegig, sind doch die die Harnbereitung steuernden Kräfte nicht nur in den einfachen Formen der Osmose oder der Filtration zu sehen, sondern wir haben offensichtlich weitaus kompliziertere Vorgänge vor uns, deren Natur noch nicht bekannt ist, von denen wir aber wissen, daß Hormone in sie eingreifen. Es sei hier erinnert an die durch herabgesetzte Wasserrückresorption hervorgerufene Harnflut infolge Fehlens oder Unterproduktion von Hypophysenhinterlappenhormon (Diabetes insipidus) oder an die Tatsache einer abnorm tiefen Glukoseschwelle bei Fehlen von Nebennierenrindenhormon (Morbus Addison), und die Frage einer renalen Insulinwirkung fügt sich zwanglos in den größeren Problemkreis der für die Harnbereitung wesentlichen extrarenalen Faktoren ein.

Man hat denn schon mehrfach versucht, die oben dargelegte Fragestellung experimentell zu klären, jedoch ergeben sich für die in situ belassene Niere des Säugers erhebliche methodische Schwierigkeiten. Wenn man dem Tier Insulin injiziert, eventuell auch in die A. renalis, um die Wirkung dieses Insulins auf die Niere zu prüfen, wird sich in jedem Falle der Blutzucker des Tieres unter der Insulinwirkung senken, und mithin wird auch der Glukosegehalt des Vorharns vermindert werden. Auf diese Art und Weise läßt sich eine isolierte Nierenwirkung des Insulins niemals beobachten, man muß die Versuche am

durchströmten überlebenden Nierenpräparat machen, dessen Durchströmungsflüssigkeit in ihrem Glukosegehalt unter Insulin nicht alteriert wird. Das Arbeiten mit der künstlich durchströmten überlebenden Warmblüterniere ist jedoch infolge der Empfindlichkeit derselben gegen Sauerstoffmangel nicht ganz einfach, und Schlüsse auf die Betätigungsart der gesunden in situ belassenen Niere sind nur mit Vorsicht zu ziehen, außerdem waren wir infolge Mangels an geeigneten Versuchstieren gar nicht in der Lage, uns Herz-Lungen-Nierenpräparate vom Warmblüter anzufertigen, so daß wir schon aus diesem Grunde auf das Arbeiten am Kaltblüter, am Frosch, angewiesen waren. Der träge Stoffwechsel der Kaltblütergewebe macht die Niere des Frosches weitgehend unempfindlich gegen Sauerstoffmangel, der durch Sättigung der Durchströmungsflüssigkeit mit O_2 beseitigt werden kann, und zudem bietet die Froschniere für alle Untersuchungen über die Harnbereitung den unschätzbaren Vorzug der doppelten Gefäßversorgung, seit deren Entdeckung durch Nussbaum sie zu den beliebtesten Versuchsobjekten im Dienste der Nierenphysiologie geworden ist.

Methodik.

Das Ziel der Versuche war die Lösung der Frage, ob das Insulin einen Einfluß auf die Zuckerausscheidung der isolierten Niere hat und, wenn ja, wie das Insulin dann in den Filtrations-Rückresorptionsmechanismus der Glukose in der Niere eingreift. Es lag unter der Annahme eines renalen Angriffspunktes des Insulins nahe, zu vermuten, daß die Wirkungsweise etwa in einer Förderung der Glukoserückresorption bestände, möglicherweise derart, daß die Aufnahme von Glukose in die Tubulusepithelien in Form von Glykogen unter Mitwirkung des Insulins zu denken sei. Vielleicht wäre auch eine Abdichtung der Glomeruluskapillaren gegen die Abdiffusion von Glukose möglich, obwohl diese letztere Vorstellung angesichts der Annahme des Glomerulus als eines Porenfilters weniger Wahrscheinlichkeit für sich hatte.

Die Durchströmung der überlebenden Froschniere ermöglicht eine Insulinisierung des Organs ohne gleichzeitige Änderung des Glukosegehalts der Durchströmungsflüssigkeit, und die doppelte Gefäßversorgung der Froschniere gestattet es, einen Stoff, dessen Wirkung auf die Glomeruli man prüfen will, vorwiegend diesen (bei Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen) durch die Aorta zuzuführen, während man den gleichen Stoff in erster Linie an die Tubuli durch die V. renoportalis heranbringt. Es soll hier nicht ausführlich darauf eingegangen werden, inwieweit die besondere Gefäßversorgung der Froschniere tatsächlich die Funktion der Glomeruli und Tubuli getrennt zu untersuchen erlaubt, im großen und ganzen ist die Methode der doppelten Durchströmung für unsere Versuchsziele geeignet.

Die Experimente gliedern sich gemäß der Fragestellung in mehrere Reihen:

1. Versuche zur Gewinnung eigener Anschauungen über die Zuckerausscheidung unbeeinflußter Nieren.

2. a) Die Zuckerausscheidung unter Insulinmangel, d. h. durch Nieren diabetisch gemachter Tiere. Der Diabetes wurde durch eine

am Vortage vorgenommene Pankreatektomie ausgelöst und am Blutzucker der betreffenden Tiere nachgewiesen. (Die Pankreasexstirpation wurde am Vortage aus der Erwägung heraus vorgenommen, daß infolge des langsamen Stoffwechsels des Kaltblüters beim unvorbehandelten nichtdiabetischen Tier Inselhormon längere Zeit an den einzelnen Zellen haften könnte und dadurch weiterwirkt, so daß bei der kurzfristigen Durchströmung am unvorbehandelten Präparat die Nierenfunktion nicht ohne Insulinwirkung abliefe.)

b) Die Zuckerausscheidung bei Nieren diabetischer Tiere in zwei Phasen, in der zweiten Phase unter Durchströmung mit insulinhaltiger Flüssigkeit.

3. Die Zuckerausscheidung durch die Nieren insulinisierter Tiere. (Die Frösche erhielten 20—1 Stunde vor Versuchsbeginn toxische Insulindosen.)

4. Die Zuckerausscheidung unvorbehandelter Nieren unter Insulinbeeinflussung des Tubularapparates. (Durchströmung von der V. renoportalis her mit insulinhaltiger Flüssigkeit.)

5. Die Zuckerausscheidung der Niere unter Beeinflussung durch Insulin des Glomerularapparates:

a) bei doppelter Durchströmung mit insulinhaltiger aortaler Flüssigkeit;

b) durch Druckeinwirkung auf die Glomeruli nach Insulinzuführung in dieselben.

Als Durchströmungsflüssigkeit benutzten wir nach dem Vorschlag von HÄUSLER[1] eine modifizierte MINES-Lösung[2], die das Kalzium in Lösung hält und ausreichend gepuffert ist. Als Puffersystem wurde ein Gemisch von Na-Azetat und Borsäure verwandt, nicht CO_2 und $NaHCO_3$, damit die Gefahr auf jeden Fall ausgeschaltet wurde, daß eventuell freiwerdendes CO_2 von den Zellen aufgenommen wird, anstatt daß die Zellen CO_2 an die Durchströmungsflüssigkeit abgeben. Im einzelnen hatte die Durchströmungsflüssigkeit folgende Zusammensetzung:

$NaCl$: 0,6%
KCl : 0,01%
$CaCl_2$: 0,02%
H_3BO_3: 0,031%
CH_3COONa plus $3\,H_2O$: 0,068% (Borsäure und Na-Azetat m/200).

Vor und während des Versuches perlte Sauerstoff durch die Flüssigkeit, die aus MARIOTTEschen Flaschen das Präparat durchströmte. Der Durchströmungsflüssigkeit wurde Glukose in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Die Technik der Präparation der Frösche (männlicher Esculenten) und der Durchströmung war die von BAINBRIDGE, COLLINS und MENZIES[3] und darf übergangen werden, da sie schon des öfteren in der Literatur mitgeteilt wurde. Die aus den MARIOTTEschen Flaschen ausströmende Flüssigkeit wurde durch genaue Markierung gemessen. Die aus der V. cava inf. des Frosches ausströmende Durchspülungsflüssigkeit wurde ebenfalls genau gemessen, dabei handelte es sich allerdings um die Summe der in die Aorta und die V. abdominalis eingeströmten Flüssigkeiten. Mengenmäßig genau bestimmt wurde ferner noch der

sezernierte „Harn". Bei dem benutzten Insulin handelte es sich in einigen wenigen Fällen (Insulinisierung des Gesamttieres vor dem Versuch) um Alt-Insulin Bayer, im übrigen verwandten wir Insulin Degewop, das uns die Schering AG., Berlin, zur Verfügung stellte*.

Um bei liegenden Kanülen den notwendigen Wechsel der Durchströmungslösungen vornehmen zu können, verbanden wir die MARIOTTEschen Flaschen mit einem Dreiwegehahn, der seinerseits wieder durch Schlauch und Kanüle mit dem in Frage kommenden Gefäß des Frosches (Aorta oder V. abdominalis) verbunden war. So wurde es leicht ermöglicht, daß in das betreffende Gefäß einmal reine und einmal insulinhaltige Flüssigkeit einströmen konnte. Der „Harn" wurde in Glaskanülen, die in den Ureteren eingebunden lagen, aufgefangen und ebenso wie die Durchströmungsflüssigkeiten nach HAGEDORN-JENSEN (wenn möglich in Doppelbestimmungen) auf seinen Zuckergehalt hin untersucht. Die Drucke, unter denen die Flüssigkeiten in das Präparat einströmten, wurden so gewählt, daß der Druck in der V. abdominalis die Hälfte des in der Aorta herrschenden betrug, weil auf diese Weise die Druckverhältnisse am ähnlichsten denen der in situ befindlichen Niere sind, und außerdem so die größte Garantie dafür gegeben ist, daß die durch die Aorta eingeströmte Flüssigkeit die Glomeruli und die von der V. abdominalis einlaufende die Tubuluskapillaren passiert, was für die Lokalisation der Insulinwirkung von ausschlaggebender Bedeutung ist. Die Höhe der Drucke wurde in der Aorta zu 24 cm Wasser und in der V. abdominalis zu 12 cm Wasser gewählt.

Versuchsergebnisse.

Zunächst wurde am nicht vorbehandelten Nierenpräparat die Ausscheidung des Zuckers studiert. Wir hatten folgende Ergebnisse:

1. Bei Durchströmung nur von der Aorta aus, d. h. bei einem Flüssigkeitsstrom Aorta — A. renalis — Glomeruli — Vasa efferentia — Vv. renales — V. cava inf. wird Urin sezerniert. Die Menge des produzierten Harns ist abhängig vom Druck, unter dem die Flüssigkeit in das Präparat einströmt: Je höher der Druck, desto größer die Harnmenge. Sie betrug in unseren (4) Versuchen bei einem Druck von 24 cm Wasser 0,51 cm^3 in 1 Stunde für beide Nieren. (Durchschnittliches Nierengewicht 0,2 g.)

2. Bei Durchströmung allein von der V. abdominalis aus, d. h. bei einem Flüssigkeitsstrom V. abdominalis — V. renoportalis — Tubuluskapillaren — Vv. renales — V. cava inf. konnte bei einem Druck von 12 cm Wasser keine Diurese erzielt werden.

3. Bei doppelter Durchströmung (von der Aorta und der V. abdominalis aus) konnten wir in allen Fällen eine Diurese in Gang bringen. In diesen Versuchen (7 Versuche an Winterfröschen, 25 an Sommerfröschen) lag die Urinsekretion (je Stunde und beide Nieren) mit 0,74 cm^3 bei Sommerfröschen und 0,61 cm^3 bei Wintertieren etwas höher als bei rein arterieller Durchströmung. Da in diesen Versuchen

* Der Schering AG., Berlin, bin ich für die Überlassung des Insulins zu größtem Dank verpflichtet.

jedoch der arteriell eingeströmte Anteil der Durchströmungsflüssigkeit mengenmäßig unter der Durchströmungsmenge bei rein arterieller Durchströmung liegt, stellt die Harnmenge hier einen größeren Prozentsatz der aortalen Durchströmungsflüssigkeit dar, als es in den unter 1. geschilderten Versuchen der Fall ist.

4. Es ist möglich, eine Diurese zu erzeugen, wenn man nach sorgfältiger Unterbindung aller venösen Abflüsse von der Aorta aus die Flüssigkeitssäule mit einem bestimmten Druck auf dem Nierengefäßsystem lasten läßt. Diese Form der Diurese soll in der Folge kurz als „Druckdiurese" bezeichnet werden, weil hier nach unseren Vorstellungen nur durch den auf den Glomeruli lastenden Druck Harn sezerniert wird, der dann ein reines Filtrat darstellen muß. Die so erhaltene Harnmenge ist in unseren Versuchen nicht verändert gewesen gegenüber der bei Durchströmung des Präparats erzielten (0,62 cm^3/Stunde in 5 Versuchen).

Diese Ergebnisse sind ein Beleg dafür, daß die Untersuchungen NUSSBAUMs[4] im wesentlichen richtig sind und daß die Froschniere für unsere Versuche ein geeignetes Objekt ist.

Was nun die Ausscheidung von Glukose durch die Nieren anlangt, so kann mit der hier geübten Versuchstechnik wegen der zu geringen Harnproduktion nichts über die Nierenschwelle für Glukose ausgesagt werden. Da einerseits zu jeder Harnzuckerbestimmung mindestens 0,1 cm^3 Sekret je Niere vorhanden sein mußte und wir andererseits die Durchströmungszeiten so kurz als möglich wählten, um eine Nierenschädigung zu vermeiden, mußte als Maß für die Zuckerausscheidung ein anderes Kriterium gesucht werden. Wenn man die Glukosekonzentration des endgültigen Harns von dem gleichen Wert der Durchströmungsflüssigkeit subtrahiert, bekommt man einen Wert, der die Ausscheidungsfähigkeit der Niere für Glukose ebenfalls charakterisiert.

Allerdings ist dieser Wert nicht identisch mit dem Begriff der Nierenschwelle, denn bei diesem handelt es sich um die Glukosekonzentration des Plasmas, bei der Zucker im Urin eben zu erscheinen beginnt, so daß eine Subtraktion beider Werte in der angegebenen Weise nicht in Frage kommt. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß für den definierten Differenzwert in der Literatur meist der Ausdruck „Nierenschwelle" gebraucht wird, seine Verwendung ist in den vorliegenden und gleichartigen anderen Versuchen unseres Erachtens jedoch nicht statthaft. Wir haben an seiner Stelle den Ausdruck: Plasmazucker-Harnzuckerdifferenz oder einfach Zuckerdifferenz gewählt. Dabei ist über das Zustandekommen dieser Differenz selbstverständlich noch nichts zu sagen. Bei allen Angaben über die Zuckerdifferenz bezieht sich diese stets auf den Zuckergehalt der aortalen Durchströmungsflüssigkeit.

Bei doppelter Durchströmung ergab sich, daß die Zuckerdifferenz für Winterfrösche bei 49,3 mg-% lag (13 Versuche), für Sommerfrösche dagegen (23 Versuche) bei 32,2 mg-%. Die Nieren von Winterfröschen sind also zweifellos undurchlässiger für Glukose als die von Sommerfröschen. Die Zuckerdifferenz bei rein aortaler Durchströmung

betrug in 5 Versuchen an Sommerfröschen 36,8 mg-%. Die Zuckerdifferenz bei „Druckdiurese" von der Aorta her (24 cm Wasserdruck) betrug 13,5 mg-% (7 Versuche an Sommerfröschen).

Während die bei aortaler Durchströmung erhaltene Zuckerdifferenz sich also nicht erheblich von der bei doppelter Durchströmung erhaltenen unterscheidet, ist der bei „Druckdiurese" erhaltene Wert erheblich vermindert.

Bei Durchströmung glukosefreier aortaler Lösung und glukosehaltiger Lösung durch die V. renoportalis ließ sich zeigen, daß unter den üblichen Durckbedingungen Glukose im Harn auch bei hohen Konzentrationen (bis etwa 250 mg-% in der venösen Flüssigkeit) nicht erscheint, daß Zucker demnach nicht aus den Tubuluskapillaren in die Harnkanälchen übertritt. Das Tubulusepithel ist rückläufig impermeabel für Glukose.

Ein Insulinmangeldiabetes läßt sich am Tier am leichtesten durch die Pankreatektomie erzeugen. Für die Nieren derartiger Versuchstiere müßte eine etwa vorhandene Insulinwirkung ausfallen. Wegen des langsamen Stoffwechsels und der dadurch bedingten langsamen Entwicklung eines Diabetes nahmen wir die Pankreatektomie mindestens 24 Stunden vor Beginn der Präparation der Nieren vor, was sich als ausreichende Zeitspanne erwies.

In Urethannarkose wurde das Abdomen des Tieres paramedian eröffnet und nach sorgfältiger Blutstillung das Pankreas entfernt. Bei der Sektion am folgenden Tage zeigten sich in wenigen Fällen hämorrhagische Infarzierungen des Darmes im Bereich des Duodenum. In mehreren Fällen waren Magen und Darm mit zähem glasigem Schleim gefüllt. Ganz auffällig war in allen Fällen die nicht zu übersehende Bluteindickung und Blutmengenverminderung, die nicht durch den geringen operativen Blutverlust erklärt werden kann. Das Blut war schleimig und fadenziehend, und oft reichte die bei Dekapitation gewonnene Blutmenge nicht einmal zur Zuckerbestimmung.

Während in Kontrollversuchen der durchschnittliche Blutzucker des verwendeten Tiermaterials zu 27 mg-% bestimmt wurde, stieg er 24 Stunden nach Pankreatektomie auf einen Mittelwert von 86 mg-%; es hatte sich demnach eine deutliche Hyperglykämie entwickelt. In diesem Zustand erfolgte die Anfertigung des Nierenpräparates und die Durchströmung unter den gleichen Bedingungen wie am nicht vorbehandelten Tier. Während wir von 10 verwertbaren Versuchen 7 Durchströmungen ohne Insulinzusatz durchführten, wurden 3 Versuche zweiphasig gestaltet, indem unter gleichen Bedingungen in der zweiten Phase der venös einströmenden Flüssigkeit Insulin beigegeben wurde, und zwar in folgenden Konzentrationen: 1:1000, 1:2000, 1:4000. Die pankreatektomierten 7 Tiere der 1. Versuchsreihe — es handelte sich ausschließlich um Sommerfrösche — wiesen bei Durchströmungen mit Glukosekonzentrationen zwischen 73 und 245 mg-% eine durchschnittliche Zuckerdifferenz von 34 mg-% auf, die sich

nicht wesentlich von der unvorbehandelter Sommerfrösche unterschied. Die 3 Tiere der 2. Versuchsgruppe hatten dagegen eine durchschnittliche Zuckerdifferenz von 27 mg-%, die sich jedoch unter den angegebenen Insulinkonzentrationen in der renoportalen Flüssigkeit auf 15,6 mg-% erniedrigte, also um 11,4 mg-% sank. Wenn auch die Zahl der Versuche zu gering ist, um aus den Ergebnissen eine Gesetzmäßigkeit ableiten zu können, so muß doch geschlossen werden, daß eine Insulinwirkung im Sinne einer Förderung der Reabsorption von Glukose nicht stattgefunden haben kann. Wenn eine derartige Wirkung aufgetreten wäre, dann müßte man keine Erniedrigung, sondern eine Erhöhung der Zuckerdifferenz finden, weil die Harnzuckerkonzentration infolge vermehrter Rückresorption kleiner geworden wäre.

Bei der Betrachtung der Insulinwirkung, die durch Injektion vor Anfertigung des Nierenpräparates erzeugt wird, muß betont werden, daß den Tieren Insulin in toxischer krampferzeugender Dosis gegeben wurde. Die 30—40 g schweren Frösche erhielten 20—1 Stunde vor der Operation 4,5 und 5 Einheiten Alt-Insulin Bayer subkutan, worauf der Versuch in der üblichen Anordnung vorgenommen wurde. Die Zuckerdifferenz wurde zu 42 mg-% im Mittelwert bestimmt. Da es sich bei den 3 Tieren um Winterfrösche handelte, wäre das eine Erniedrigung des Wertes um 7,3 mg-% gegenüber unvorbehandelten Winterfröschen, deren Harnproduktion unter gleichen Bedingungen auch deutlich größer war. Auch diese Versuchsergebnisse sprechen gegen eine reabsorptionsfördernde Insulinwirkung, da sich bei einer solchen die Zuckerdifferenz nicht senken, sondern erhöhen müßte.

Im Hinblick auf den vermuteten Insulineffekt auf die Tubularepithelien waren uns die (9) Versuche mit selektiver Beeinflussung der Tubuli von besonderer Bedeutung. Die Durchströmung erfolgte in der ersten Phase mit insulinfreier Lösung von der V. renoportalis aus, in der zweiten mit insulinhaltiger, wobei steigende Konzentrationen (Insulin Degewop) von 1:10000000—1:1000 verwandt wurden. Der in der ersten Durchströmungsphase gewonnene „Harn" wurde dann hinsichtlich seines Glukosegehaltes mit dem in der zweiten Phase gewonnenen verglichen. Bei dieser Versuchstechnik erniedrigte sich die Zuckerdifferenz in 4 Fällen, blieb in einem gleich und erhöhte sich in weiteren 4 Fällen. Die Schwankungen der Zuckerdifferenz betrugen bis zu $\pm$ 4,2 mg-%. Weder konnte eine gesetzmäßige Änderung der Glukoseausscheidung überhaupt gefunden werden, noch eine Beziehung zwischen der Insulinkonzentration und den Veränderungen der Zuckerdifferenz. Im Gegensatz dazu ergab sich eine eindeutige Wirkung des Insulins auf die Größe der Harnsekretion im Sinne einer Oligurie. Es war jedoch nicht nur die Urinmenge vermindert, auch die Menge der durchströmenden Flüssigkeit war deutlich verkleinert, in einigen

Fällen kam es sogar zu Anurie bei völligem Stillstand der Durchströmung. Die arterielle Durchströmungsmenge war im Durchschnitt um 41% in der zweiten Phase gegenüber der ersten herabgesetzt, die venöse um 42%, die Harnsekretion um 50%. In einigen Fällen ergab sich eine verblüffende Übereinstimmung in der prozentualen Minderung von Durchströmungsmenge und Harnsekretion.

Tabelle 1.

Versuch Nr.	Arterielle Durchströmung %	Venöse Durchströmung %	Harnsekretion %
43	Verminderung: 71	79	70
44	46	41	45
45	82	61	77

Die Zahlen, die sich auf die Durchströmung beziehen, bedeuten die prozentuale Verminderung der Durchströmung in der zweiten Phase (mit Insulin) gegenüber der ersten. Die Zahlen der Harnsekretion bedeuten das Analoge. Sämtliche Werte sind auf Durchströmungsdauern von je 1 Stunde berechnet.

Auch für die selektive Beeinflussung der Glomeruli bei doppelter zweiphasiger Durchströmung ließ sich kein eindeutiges Ergebnis gewinnen. Das Insulin (Insulin Degewop) wurde in Konzentrationen von 1:3000—1:700 der aortalen Durchströmungsflüssigkeit zugesetzt. Die Veränderungen der Zuckerdifferenz betrugen bis zu $\pm$ 4,6 mg-%, und ihre Richtung war nicht eindeutig festgelegt (3mal Erhöhung, 3mal Erniedrigung, 1mal Gleichbleiben); sie war nicht abhängig von der Insulinkonzentration. Auch in diesen Versuchen fanden sich Oligurie und Verminderung der durchgeströmten Flüssigkeitsmengen in folgendem Ausmaß:

Tabelle 2.

	Arterielle Durchströmung %	Venöse Durchströmung %	Harnsekretion %
Verminderung . .	39	35	50

Erklärung s. Tabelle 1.

Eine etwaige sinnvolle Insulinwirkung könnte sich an den Glomeruli nur in einer Verdichtung der Membran entfalten, die die Abdiffusion von Glukose verhinderte oder erschwerte. Dann müßte aber eine Erhöhung der Zuckerdifferenz zu finden sein. Die Ergebnisse lassen einen derartigen Schluß nicht zu.

Bei Ausschaltung des Flüssigkeitsstroms durch die Tubuluskapillaren infolge rein arterieller Durchströmung müßte eine glomeruläre Insulinwirkung noch deutlicher werden. Zwei Versuche mit

Insulinkonzentrationen von 1:1000 und 1:1500 bei rein aortaler Durchströmung zeigen jedoch wiederum nur die Verminderung der Durchströmungsmengen und keinerlei Einfluß auf die Zuckerdurchlässigkeit der Nieren.

Bei der sog. „Druckdiurese", d. h. bei einem von der Aorta her auf den Nierengefäßen lastenden Druck bei Versperrung des möglichen Ausstroms ist dieser Druck die einzige in Frage kommende Kraft (Filtrationsdruck) für die Sekretion von Harn, der dann infolge des Ausfallens der Rückresorption ein reines Glomerulusfiltrat darstellt. Läßt man mit dieser Methodik in einer 1. Phase Harn produzieren, durchströmt dann mit insulinhaltiger Flüssigkeit, bringt also Insulin an die Glomeruli heran und läßt dann in einer 3. Phase diese insulinhaltige Flüssigkeit den Druck ausüben, so erhält man in den Harnglukosekonzentrationen der 1. und 3. Phase vergleichbare Werte. Mit dieser Versuchsanordnung ließ sich hinsichtlich der Zuckerdifferenz kein Insulineinfluß feststellen, ebenso nicht hinsichtlich der Größe der Urinproduktion.

Es sei im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Druckdiurese an dieser Stelle hervorgehoben, daß man in dem durch die geschilderte Versuchsanordnung (auch ohne Insulineinfluß!) gewonnenen Harn nie die gleiche Konzentration an Dextrose findet wie in der Durchströmungsflüssigkeit, wenn auch die Harnzuckerkonzentration sich stark deren Zuckerkonzentration nähert. Jedenfalls liegt der Harnzuckergehalt immer erheblich höher als es in Urinen, die bei doppelter Durchströmung gewonnen wurden, der Fall ist. Für die Zuckerdifferenz heißt das: diese ist bei „Druckdiurese" stets vermindert und nähert sich (relativ zu den Werten bei doppelter Durchströmung) 0, ohne 0 jedoch zu erreichen.

Besprechung der Ergebnisse.

Ausschlaggebend für den gesamten hier aufgeworfenen Problemkomplex ist die Frage nach der Art und Weise des Zustandekommens der Zuckerdifferenz und nach der Lokalisation der Glukoseretention. Kommen wir mit den üblichen Vorstellungen der Filtrations-Rückresorptionstheorie nach CUSHNY[5] aus, oder sind die Verhältnisse bei Amphibien etwa anders?

Die Befunde hervorragender Kenner der Nierentätigkeit von Amphibien in vivo und bei Durchströmung wie WHITE[6], der mit Necturus arbeitete, und HÖBER[7] sprechen dafür, daß Glukose in den Tubuli rückresorbiert wird. Der gleichen Meinung sind neben vielen anderen Autoren WAKU[8] und ENDO[9], während andere japanische Autoren, die sich eingehend mit dieser Frage befaßt haben, den Sitz der Glukoseretention in erster Linie in den Glomerulus verlegen (MITAMURA[10], HOSAYA[11], IMAGAWA[12]). Eigene (nicht veröffentlichte) Versuche sprechen für die Möglichkeit einer Rückresorption von Glukose und Wasser in

den Tubuli von Winterfröschen (R. temporaria), jedoch muß betont werden, daß die Rückresorptionskapazität des Frosches größenordnungsmäßig weit unter der des Säugers liegt. Schon der anatomische Aufbau der Froschniere mit ihrem wenig ausgebildeten dünnen Schenkel der Henleschen Schleife und die im Vergleich zum Säuger weitaus größere Harnmenge, die bis 30% des Eigengewichtes des Tieres je Tag betragen kann[13] und die gegenüber dem Blut deutlich hypoton ist, sprechen gegen eine Bedeutung der Rückresorption, wie sie an Säugern von Poulsson[14] und von Shannon und Fisher[15] speziell für Glukose erwiesen ist. Für die Amphibienniere (sicher für R. temporaria und bufo jap.) wird demnach der Sitz der Glukoseretention nicht nur in den Tubuli, sondern ebensogut und wahrscheinlich noch mehr in der Undurchlässigkeit der Glomeruluskapillaren zu suchen sein. Diese Anschauung, nach der das Glomerulusfiltrat hinsichtlich der Glukose dem Plasma nicht äquimolekular ist, sondern weniger Zucker enthält, der dann auch noch rückresorbiert werden kann, wird auch durch die eigenen Versuche gestützt, wenigstens im Bereich der von uns angewandten Glukosekonzentrationen. So ist z. B. die Zuckerdifferenz bei „Druckdiurese" erheblich herabgesetzt, erreicht aber nie den Wert 0, was sie unter 2 Voraussetzungen tun müßte: 1. Wenn der produzierte „Harn" tatsächlich reines Glomerulusfiltrat wäre und 2. wenn — bei Allgemeingültigkeit der Annahmen der Filtrations-Rückresorptionstheorie — im Glomerulusfiltrat Glukose in gleicher Konzentration wie in der Durchströmungsflüssigkeit enthalten wäre. Clark[16] gibt an, daß bei doppelter Durchströmung an Winterfröschen erst dann Zucker im Urin auftrat, wenn die Glukose in der Durchströmungsflüssigkeit einen Wert von 52 mg-% überschritten hatte, was sich auffallend mit der Zuckerdifferenz unserer Winterfrösche von 49 mg-% deckt. Die Unterschiede zwischen der Nierenfunktion von Sommer- und Wintertieren sind ein Teil der Änderung der Betätigungsweise in den Exkretionsorganen im jahreszeitlichen Rhythmus, wie sie von Ellinger und Hirt[17] in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen am lebenden Tier sogar färberisch demonstriert werden konnten.

Die Niere darf in ihrer Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel nicht als schematisch arbeitendes starres Überlaufventil für Glukose angesehen werden, wobei die Größe der Glykosurie allein von der Höhe des Blutzuckerspiegels abhängt. Vielmehr muß man in der Zuckerdifferenz und der Nierenschwelle auch einen Ausdruck des Funktionszustandes der Niere selbst sehen, denn diese Werte sind durchaus nicht starr festgelegt und werden in ihrer Veränderlichkeit offensichtlich von Faktoren bestimmt, die nicht nur in der Blutglukose zu suchen sind. Die klinischen Erfahrungen am Bilde der sog. renalen Glykosurie sprechen ganz in diesem Sinne, wobei jedoch noch nicht erwiesen ist, ob es sich bei dieser Form einer abnorm hohen Zuckerdurchlässigkeit der Niere tatsächlich um eine Glukosereabsorptionsstörung handelt wie etwa bei der Phlorrhizinglykosurie, oder ob andere Gründe für das Auftreten einer solchen renalen Glykosurie verantwortlich zu machen sind. Die Tatsache, daß einem sich manifestierenden Diabetes mellitus oft jahrelang eine renale Glykosurie ohne Hyperglykämie voraufgeht, bzw. daß an derselben Person Zeiten eines echten manifesten Diabetes mit solchen nur renaler Glykosurie abwechseln, läßt die Vermutung (Lichtwitz[18]) naheliegen, daß auch die renale Glykosurie letztlich eine Folge des Insulinmangels sein könnte. Es soll nach Lichtwitz durch Insulin zur Hemmung der Glykogenbildung in den Nierenzellen kommen (im Gegensatz zur Leber), bei Insulinmangel dagegen zu übersteigerter Glykogenbildung und Glykosurie. Andererseits ist im Widerspruch zu dieser Hypothese die Nichtbeeinflußbarkeit der renalen Glykosurie durch Insulin bekannt und kann nur mit einer Insulinresistenz der Niere erklärt werden. Eine therapeutische oder experimentelle Beeinflussung der renalen Glykosurie bedeutet Änderung der Nierenschwelle für Glukose bzw.

der Zuckerdifferenz, und es sind schon mehrfach Versuche in der Richtung gemacht worden, bestimmte Beziehungen zwischen diesen Größen und Inkretdrüsen zu finden. HETÉNY[19] z. B. fand unter Schilddrüsenextrakt eine Erniedrigung des Schwellenwertes, unter Parathormon ein Gleichbleiben (Ca-Stoffwechsel), während Insulin „wahrscheinlich" eine Erhöhung zur Folge hatte. Keinen Einfluß des Insulins auf den Glukoseschwellenwert der Niere fand ELIAS und GÜDEMANN[20] am Menschen, während MAROCCHINI und NATALE[21] ein Absinken des Schwellenwertes unter Insulin feststellen konnten. Erhöhung des Schwellenwertes durch Inselhormon fanden SORGE[22] am Menschen und keinen Effekt oder manchmal eine geringfügige Erhöhung BUFANO[23] an Hunden, letzterer zum Teil bei direkter Einführung des Insulins in die Nierenarterie, wobei die Dosierung allerdings weit über dem physiologischen Maß lag. Zwei besonders interessierende Arbeiten am Kaltblüter sind die von VAN CREVELD und VAN DAM[24], die sowohl am Froschnierenpräparat bei Durchströmung mit insulinhaltiger Flüssigkeit als auch bei Durchströmung der Nieren eines vorher insulinisierten Tieres eine Verminderung der Zuckerdurchlässigkeit der Niere feststellen zu können glaubten, und die von SHOJI[25]. Dieser findet bei Durchströmung der Nieren japanischer Kröten sowohl bei glomerulärer als auch tubulärer Applikation des Insulins in einer Konzentration von 1:1000 eine Verstärkung der Glykosurie, die bei höheren Insulindosen wieder zum Verschwinden gebracht werden kann. Insulin in einer Konzentration von 1:2000 war nicht mehr wirksam. Im übrigen weist SHOJI auf die unter Insulinwirkung auftretende Oligurie hin.

Man darf wohl die in diesen Versuchen verwendeten Insulindosen als unphysiologisch hoch bezeichnen und muß sich hüten, aus der Wirkung solch großer Hormongaben auf deren physiologische Aufgabe zu schließen.

In den eigenen Versuchen war weder bei hohen (toxischen) noch bei physiologischen Insulindosen ein gesetzmäßiger Einfluß auf die Zuckerdurchlässigkeit der Niere erkennbar. Es war dabei gleichgültig, ob das Insulin der aortalen oder der venösen Durchströmungsflüssigkeit zugesetzt worden war. Die gefundenen Unterschiede in der Zuckerdifferenz der Nieren waren eine Folge des verschiedenen Tiermaterials (Sommer- und Wintertiere) und der verschiedenen Formen der Durchströmung. Auffallend war jedoch die unter Insulin regelmäßig auftretende Oligurie, die mit einer Verminderung der arteriellen und venösen Durchströmungsflüssigkeit gleichermaßen ungefähr parallel ging. Das könnte man auf eine allgemeine Vasokonstriktion, vielleicht auch auf eine Quellung der Zellen der Niere zurückführen, hat aber sicher nichts mit der physiologischen Aufgabe des Insulins zu tun. Jedenfalls konnte durch die vorliegenden Experimente die Existenz eines renalen Angriffspunktes des Insulins nicht erwiesen werden.

Zusammenfassung.

Am durchströmten Froschnierenpräparat nach BAINBRIDGE, COLLINS und MENZIES werden die Ausscheidungsbedingungen für Glukose untersucht. Glukose wird in den Nieren durch die Glomeruli ausgeschieden, die Tubularepithelien sind in Richtung Blut-Harnkanälchen undurchlässig für Glukose.

Der durch Subtraktion der Glukosekonzentration des Harns von der der Durchströmungsflüssigkeit erhaltene Wert wurde als „Zuckerdifferenz" bezeichnet. Sie liegt für Winterfrösche mit 49 mg-% deutlich höher als die der Sommerfrösche von 32 mg-%. Die Nieren von Winterfröschen sind demnach für Glukose „dichter" als die von Sommerfröschen. Die Glukosekonzentration des Harns ist auch bei Filtration des Urins durch Druckeinwirkung von der Aorta her nie gleich der einströmenden bzw. Druck ausübenden Flüssigkeit, was im Sinne einer gewissen Zuckerretention in den Glomeruli gedeutet werden muß.

Die Durchlässigkeit der Niere für Glukose pankreatektomierter diabetischer Frösche ist gegenüber der unvorbehandelter Tiere nicht verändert und wird auch durch späteren Insulinzusatz in der Durchströmungsflüssigkeit nicht beeinflußt.

Die Zuckerdurchlässigkeit der Niere von Fröschen, die mit toxischen Insulindosen vorbehandelt waren, ist nicht eindeutig gegenüber der Norm verändert.

Ebensowenig ändert Insulinzusatz zur venösen Durchströmungsflüssigkeit die Zuckerdifferenz als Ausdruck für die Durchlässigkeit der Niere für Glukose in den Konzentrationen von 1 : 1000—1 : 10000000 oder Insulinzusatz zur aortalen Durchströmungsflüssigkeit bei doppelter oder rein arterieller Durchströmung oder bei Harnproduktion allein durch Druckeinwirkung.

In allen Fällen insulinbehandelter Nieren trat als Folge eine ausgesprochene Oligurie auf. Die Verminderung der Harnmenge ging der Verminderung der durchströmten Flüssigkeit parallel.

Literatur.

[1] Häusler: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **153**, 187 (1930). — [2] Mines: J. Physiol. (Brit.) **46**, 188 (1913). — [3] Bainbridge, Collins and Menzies: Proc. roy. Soc. Lond. **86**, 355. — [4] Nussbaum: Arch. ges. Physiol. **16**, 139 (1878); **17**, 580 (1878). — [5] Cushny: Die Absonderung des Harns. Deutsche Übersetzung. Jena 1926. — [6] White and Schmitt: Amer. J. Physiol. **76**, 483 (1926). — [7] Höber: Pflügers Arch. **233**, 181 (1933). — [8] Waku: Trans. jap. path. soc. **17**, 394 (1929). — [9] Endo: Jap. J. Ur. (e.) **24**, 855 (1935). — [10] Mitamura: Transact. of the 6th congr. of the far eastern assoc. of trop. med., Bd. 1, S. 927. Tokyo 1925. — [11] Hosaya: Proc. imp. Acad. Tokyo **3**, 823 (1927). — [12] Imagawa: Jap. J. med. Sci., Trans. IV Pharmacol. **5**, 103 (1930). — [13] Pütter: Die Sekretionsmechanismen der Niere, S. 235. 1929. — [14] Poulsson: J. Physiol. (Brit.) **69**, 411 (1930). — [15] Shannon and Fisher: Amer. J. Physiol. **112**, 765 (1938). — [16] Clark: J. Physiol. (Brit.) **56**, 201 (1922). — [17] Ellinger u. Hirt: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **150**, 285 (1930). — [18] Lichtwitz: Klin. Wschr. **1932 I**, 626. — [19] Hetényi: Z. exper. Med. **80**, 523 (1932). — [20] Elias u. Güdemann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **119**, 119 (1926). — [21] Marocchini e Natale: Arch. fisiopat. ecc. **2**, 253 (1934). — [22] Sorge: Policlinico sez. prat. **1931 II**, 1305. — [23] Bufano: Klin. Wschr. **1934 I**, 403. — [24] van Creveld u. van Dam: Arch. neerld. Physiol. **10**, 323. — [25] Shoji: Trans. jap. path. Soc. **28**, 572 (1929).

Aus dem Pharmakologischen und Pharmazeutischen Institut
der Universität Bonn.

Untersuchungen an offizinellem und deutschem Rhabarber.

Von
Hans Haas und Hubertus Holtzem.

(Eingegangen am 16. August 1948.)

Über die abführende Wirkung des Gemüserhabarbers liegen bisher kaum experimentell gesicherte Ergebnisse vor. Nur Wallach [1] berichtet, daß auch der Gemüserhabarber die Darmpassagezeit abzukürzen vermag. Im Vergleich zur chinesischen Droge entfaltet er aber nur schwache Wirkungen, wobei die aus China eingeführte Ware noch von den in Deutschland gezüchteten Sorten von Medizinalrhabarber erheblich übertroffen wird. Aus den Angaben Wallachs ist zu entnehmen, daß vom Gemüserhabarber größere Mengen (2,5 mg/100 g Maus) benötigt werden, um überhaupt abführende Effekte zu garantieren. Demgegenüber liegen bei den in Deutschland geernteten Pflanzen die wirksamen Mengen durchschnittlich zwischen 0,6—1,7 mg/100 g Maus. Beim Shenzi-Rhabarber beträgt die Wirkdosis für das gleiche Tier 1,9 mg/100 g. Ähnlich gibt Führer als abführende Rhabarberdosis 1—2 mg/100 g Maus an. Die Resultate von Himmelbaur [5] liegen dagegen höher. Umgerechnet auf 100 g Maus sind 5,6 bzw. 10,1 oder 38,2 mg erforderlich. Außerdem ist für die Beurteilung der Wirkstärke auch der Zeitfaktor, d. h. die durchschnittlich benötigte Entleerungszeit in Rechnung zu stellen. Diese beläuft sich beim Gemüserhabarber im Durchschnitt auf 5,1 Stunden, beim Shenzi-Rhabarber auf 3,4 Stunden und bei den in Deutschland gezüchteten Sorten auf 1,8—4,2 Stunden. Der Gemüserhabarber besitzt somit auch in dieser Richtung nach den Untersuchungen von Wallach schlechtere abführende Eigenschaften. Trotzdem darf man diese Ergebnisse wohl nur als ein relatives Maß für die Wirkstärke der einzelnen Präparate werten, da bei der Prüfung von abführenden Drogen in der Regel sehr wechselnde Resultate erzielt werden und die angegebenen Zahlenangaben infolge der beträchtigen Streuung der einzelnen Ergebnisse und der relativ kleinen Versuchszahlen keinen absoluten Wert für eine vergleichende objektive Beurteilung der Wirkungsintensität besitzen. So fand z. B. Kröber [2] bei mehrfacher Prüfung von Rheum officinale chinense und in Deutschland gezüchtetem Rheum palmatum in einer Versuchsreihe am Menschen keinen Unterschied in der Wirkstärke für beide Drogen. Bei einer zweiten Versuchsreihe wirkte dagegen Rheum palmatum besser.

Es sollte daher in Ergänzung der vorliegenden Ergebnisse noch einmal geprüft werden, inwieweit der Gemüserhabarber im Vergleich zu verschiedenen offizinellen Sorten imstande ist, laxierend zu wirken. Darüber hinaus war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, durch eine verschiedenartige Bearbeitung und durch die Anwendung wechselnder Extraktionsverfahren zu einer Anreichung und Steigerung der Wirkung zu gelangen bzw. haltbare Präparate herzustellen und die eigentlichen wirksamen Inhaltsstoffe aufzufinden.

Als Träger der Wirkung gelten im allgemeinen beim Rhabarber Anthrachinone bzw. reduzierte Anthrachinone, wie Anthranol und Anthron, die in wechselnden Mengenverhältnissen in der Droge vorhanden sind (TSCHIRSCH). Gegen diese Auffassungen sind aber in den letzten Jahren Bedenken erhoben worden. KROEBER[2] machte zuerst darauf aufmerksam, daß Rheum off. weit mehr Anthrachinone enthält. Trotzdem ist diese Droge in ihrer therapeutischen Wirkung unter Umständen dem anthrachinonärmeren Rheum palmatum unterlegen. Auch CASPARIS und GÖLDLIN v. TIEFENAU[3], FÜHNER[4], HIMMELBAUR und WALTER[5] fanden bei experimentellen Untersuchungen, daß der Gehalt an Anthrachinonen offenbar nicht mit der therapeutischen Wirkstärke konform geht. Selbst anthrachinonfreie Auszüge beschleunigten nach KROEBER[2] noch die Stuhlentleerung. WASICKY[6] sagt daher in seinem Lehrbuch der Physiopharmakognosie, daß die Anthrachinone bzw. Anthraglykoside, die mit den gebräuchlichen chemischen Bestimmungsmethoden erfaßt werden, für die abführende Wirkung nicht verantwortlich zu machen sind. Nach seiner Ansicht sind die wirksamen Substanzen „einerseits in Verbindungen zu suchen, die durch Oxydation in Anthrachinone übergehen — solche sind im Rheum bereits nachgewiesen —, andererseits vielleicht in amorphen Substanzen, die aus Anthrachinonen und reduzierten Anthrachinonen analog wie Gerbstoffe aus Katechinen sich bilden". Entsprechende Angaben für den Gemüserhabarber liegen bisher nicht vor.

Methodik.

Für die Prüfung von abführend wirkenden Pflanzen stehen am Menschen und Tier eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Am Menschen sind als Kriterien die Kotkonsistenz und die Zeit, innerhalb der die laxierende Wirkung eintritt, brauchbar. Ergänzend kommt die Beobachtung der Darmpassage mit Hilfe des Röntgenverfahrens hinzu. Diese Technik verwandten z. B. SCHLEMMER und GENTNER[7] bzw. CZETSCH-LINDENWALD[8] und KROEBER[2] bei der Erprobung verschiedener Rumexarten bzw. offizinellen Rhabarbers.

Im Tierexperiment bedient man sich ähnlicher Verfahren. Röntgenuntersuchungen an Katzen liegen von CANNON und MAGNUS[9] vor. Daneben benutzt man am Kleintier wieder die Beobachtung der Kotkonsistenz (FÜHNER[4], STRAUB und GEBHARDT[10], CASPARIS und GÖLDLIN[3], WALLACH[1] und JARETZKY[11] und der Darmpassagezeit als Test, wobei durch Zusatz von leicht nachweisbaren Farbstoffen (Ultramarin, Methylenblau, Lydopodium, Kohlesuspension) (SCHLAGINWEIT[12], LOEWE und FAURE[13], WALTER[14]) die Durchlaufsgeschwindigkeit möglichst exakt festgelegt wird. Bei der Zufuhr der zu prüfenden Stoffe wählt man entweder die Schlundsonde als Applikationsmethode oder die Beimengung der Abführmittel zur Nahrung. Nach FÜHNER[4] hat sich die Verfütterung von Pillen besonders bewährt. Dieses Verfahren verzichtet aber auf eine genauere Festlegung des Zeitpunktes der Aufnahme und damit auf eine exakte Berechnung der Zeitintervalle zwischen Aufnahme und Ausscheidung.

Deshalb wurde bei den eigenen Versuchen die Zufuhr stets mit der Schlundsonde vorgenommen. Als Kontrastmittel diente Bariumsulfat in Wasser gelöst 1:1. Als Vehikel für die abführenden Substanzen wurde Tyloseschleim 1,5/100 benutzt, der sich als indifferent erwies. Vergleichende Versuche mit Gummi arabicum 10/100 führten zu den gleichen Entleerungszeiten. Von dem Tyloseschleim erhielten die Ratten 1 cm^3/100 g Tier, wobei abgesehen von den Leerversuchen die Rhabarberpräparate in verschiedener Konzentration diesen Flüssigkeitsmengen zugesetzt waren. Durch regelmäßige Kontrolle der Kotentleerung wurde die Darmpassagezeit mit Hilfe des Bariumsulfates ausgetestet.

Durch Heben des Schwanzes wird die Ratte zur Entleerung von Kotballen veranlaßt. Erforderlich sind hierbei die Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen und eine Prüfung der Kotentleerung in 20minütlichen Abständen. Allzu frühes und häufiges Aufheben der Tiere wirkt sich störend aus. Mit dem Beginn der Stuhlbeobachtungen beginnt man zweckmäßig stets 200 Min. nach der peroralen Zufuhr.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels statistischer Methoden (students test). In den Tabellen sind lediglich die Mittelwerte und ihr mittlerer Fehler eingesetzt. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten wurde angenommen, wenn die Differenz zur Norm den dreifachen mittleren Fehler überschritt. Zwecks besserer Übersichtlichkeit wurde in den Tabellen auf eine Wiedergabe der einzelnen Zahlenwerte für die Differenzen zur Norm und deren mittlere Fehler verzichtet und nur durch Fettdruck der Mittelwerte das positive Ergebnis gekennzeichnet.

Versuchsergebnisse.

I. Kontrollversuche.

Die Versuche zogen sich über die Zeit vom November 1946 bis Juni 1948 hin. In dieser Zeit wurden regelmäßig Leerversuche mit Tyloseschleim an einer größeren Anzahl von Tieren ausgeführt. In der Tabelle ist außerdem eine Versuchsreihe eingefügt, die im Pharmakologischen Institut in Leipzig durchgeführt wurde.

Tabelle 1. *Kontrollversuche.*

Tyloseschleim 1,5 cm³/100 g	Anzahl der Tiere	Mittelwerte in Minuten
Februar 1942, Leipzig	36	306 ± 14,2
November—Dezember 1946, Bonn	80	315 ± 1,6
Februar—März 1947, Bonn . . .	80	312 ± 2,6
April—Mai 1947	78	299 ± 5,0
Juni 1947	40	**291 ± 7,4**
Juli—August 1947	40	**251 ± 25,2**
September—Oktober 1947	80	**294 ± 11,9**
November—Dezember 1947 . . .	80	314 ± 4,1
Januar—Februar 1948	80	311 ± 3,0
April—Mai 1948	40	303 ± 5,1

Die ermittelten Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur vorliegenden Angaben. Nach JARETZKY[11] liegt die Passagezeit von Bariumsulfatbrei im Mittel bei 5 Stunden. SCHLAGINWEIT[12] gibt für Mäuse als durchschnittliche Ausscheidungszeit 5 bis 6 Stunden an.

Darüber hinaus weisen die Ratten trotz der Benutzung des gleichen Tiermaterials im Laufe des Jahres gewisse Unterschiede in den Darmentleerungszeiten auf. Die ermittelten Werte weichen teilweise so weit voneinander ab, daß bei statistischer Auswertung sichere Unterschiede gegeben sind. Im Laufe der Sommermonate ist die Passagezeit für

Bariumbrei somit gegenüber den Wintermonaten eindeutig verkürzt. Vielleicht findet die Beobachtung WALLACHs[1], daß die Tiere in ihrer Ansprechbarkeit auf Rhabarber jahreszeitliche Unterschiede aufweisen, hierin ihre Erklärung. WALLACH vermutet allerdings, daß die Drogen im Herbst und Sommer einen anderen Gehalt an Wirkstoffen beherbergen.

Während der Monate Juli und August mußten die Versuche eingestellt werden, da in diesen Sommermonaten bereits im Kontrollversuch so ungewöhnlich schnelle Darmentleerungszeiten ermittelt wurden, daß die Tiere für die Austestung von abführenden Drogen ungeeignet wurden.

Bei der Berechnung der abführenden Wirkung des Rhabarbers wurden diese Schwankungen der Normalversuche berücksichtigt. Hieraus erklärt sich, daß in den folgenden Tabellen unter Umständen selbst deutlich gesenkte Mittelwerte nicht als positives Ergebnis im Sinne einer abführenden Wirkung zu werten sind.

II. Offizinelle Rhabarbersorten.

Tabelle 2. *Offizinelle Rhabarbersorten.*

Präparate	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
Rhiz. Rhei offic. DAB.	19	0,6	313 ± 5,0
	30	1,2	276 ± 2,4
	30	2,4	266 ± 2,6
	30	5,0	273 ± 3,4
	20	20,0	267 ± 3,7
Rhiz. Rhei palmati	10	1,2	268 ± 9,2
	10	2,4	277 ± 3,7
Rhiz. Rhei Anglici	10	1,2	233 ± 2,5
	10	2,4	259 ± 4,6
Rhiz. Rhei Austriaci	10	1,2	250 ± 5,3
	10	2,4	270 ± 4,2
Rhiz. Rhei rhapontici	10	1,2	260 ± 6,7
	10	2,4	259 ± 1,7

Die Versuche mit offizinellen Rhabarbersorten aller verwendeten Drogen zeigen bei einer Dosierung von 1,2 und 2,4 mg/100 g abführende Wirkung. Besonders deutlich kommt sie beim Rheum anglicum zum Ausdruck. Allerdings ist zu bedenken, daß diese Versuche in der Frühjahrszeit durchgeführt wurden, wo bereits die Kontrollversuche relativ niedrig lagen, so daß die stärkere Wirkkraft des Rheum anglicum wahrscheinlich nur auf jahreszeitlichen Schwankungen beruht. Dafür spricht auch, daß die niedrige Dosierung fast bei allen Rhabarbersorten stärker wirkte als die höhere Gabe. Alle Versuche mit 1,2 mg je 100 g Ratte wurden im Spätfrühjahr durchgeführt; die Prüfung der Drogen mit einer Dosierung von 2,4 mg/100 g erfolgte in den Wintermonaten. Man darf daher wohl behaupten, daß alle untersuchten

Drogen etwa gleichmäßig stark wirken. Die Mittelwerte der Tabelle liegen bei statistischer Auswertung sämtlich im gegenseitigen Streubereich. Die Angaben von Führer[4] und Kroeber[1], daß zwischen den einzelnen Rhabarbersorten deutliche Wirkunterschiede bestehen, konnten somit nicht bestätigt werden.

Vergleicht man die bei der Ratte benötigten Dosen mit denen in der menschlichen Therapie üblichen Gaben, so ergibt sich, daß in beiden Fällen ähnliche Konzentrationsbereiche zur Auslösung der Wirkung benötigt werden. Hinsichtlich der Stärke der abführenden Wirkung und der Abhängigkeit von der Dosierung ließ sich für Rheum off. feststellen, daß die unteren wirksamen Grenzschwellen von 1,2 mg die Darmpassagezeit etwa gleich stark beschleunigen wie die höheren Dosen von 5—20 mg. Das Gleiche konnte auch bei anderen Rhabarberpräparaten beobachtet werden.

III. Extrakte aus offizinellen Drogen.

Tabelle 3. *DAB.-Extrakte am Rheum officinale.*

Präparat	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
Merck-Präparat unbekannten Alters	10	1.2	304 ± 18,6
	10	2,4	**279 ± 13,6**
Frisches selbstbereitetes Extrakt . .	10	2,4	**243 ± 5,0**

Auch die Extrakte aus offizinellem Rhabarber, hergestellt nach dem DAB. 6. (Dimazerationsmethode) unter Benutzung eines Original-Merck-Präparates unbekannten Alters und eines selbstbereiteten Extraktes ergaben abführende Wirkungen etwa gleichen Ausmaßes wie die ausgewerteten Drogen. Das abgelagerte ältere Präparat war gegenüber dem frischbereiteten Extrakt deutlich unterlegen. Auch Göldlin, Mühlemann und Scherrer[15] fanden, daß bei der längeren Lagerung die Wirkung abnimmt. Diese Angabe wird also durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

IV. Versuche mit einheimischem Rhabarber.

Rheum undulatum lag zur Prüfung in 4 Sorten verschiedener Provenienz vor. Die einzelnen Drogen wurden verschiedenen Trocknungsverfahren unterworfen, wobei die Trocknungstemperaturen zwischen 40—100° variiert wurden. Außerdem kam ein luftgetrocknetes Präparat zur Verwendung. Nach Göldlin v. Tiefenau[16] können die Drogen ohne Bedenken bis auf 100° erhitzt werden, ohne daß die Tätigkeit der Fermente ausgeschaltet wird.

Eine eindeutige Abhängigkeit der Wirkung vom Trocknungsgrad ließ sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ablesen. Die Mittelwerte aller Versuchsreihen lagen etwa in derselben Größenordnung

Tabelle 4.

Trocknungs-temperatur	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Rh I	Rh II	Rh III	Rh IV
100°	10	1,2	298 ± 4,6	313 ± 5,9	281 ± 3,1	271 ± 7,9
	20	2,4	288 ± 2,1	268 ± 2,6	280 ± 2,4	289 ± 2,3
	20	20,0	282 ± 2,6			
80°	10	1,2	285 ± 7,1		292 ± 3,4	260 ± 4,6
	20	2,4	271 ± 1,8	298 ± 3,6	293 ± 2,6	274 ± 3,1
60°	10	2,4	283 ± 3,3	289 ± 5,0	291 ± 2,6	
40°	10	1,2	291 ± 0	277 ± 6,1	291 ± 2,8	
Lufttrocknung	10	1,2	275 ± 3,4			
	10	2,4	279 ± 3,4			

Rh I = Mondorfer-Rotstiel; Rh II = Amerikaner; Rh III = Vierländerblut; Rh IV = Holländer.

bei der gleichen Dosierung. Die Sorte III scheint im allgemeinen etwas schwächer zu wirken und vor allem gegenüber der Sorte IV unterlegen zu sein. Insgesamt halten aber alle gefundenen Unterschiede einer statistischen Auswertung nicht stand. Alle geprüften Sorten sind demnach ziemlich gleichartig hinsichtlich ihrer Wirkungsintensität zu beurteilen. Diese Tatsache wurde auch durch die weiteren Untersuchungen erhärtet. Zwecks besserer Übersichtlichkeit sind in den folgenden Tabellen nur die Mittelwerte aller Einzelbestimmungen ohne Berücksichtigung der Rhabarbersorten eingesetzt, da immer annähernd gleiche Ergebnisse erzielt wurden.

V. Gemüserhabarber-Preßsaft.

Schenk, Lukass und Wegener[17] unterscheiden bei der Zubereitung pflanzlicher Präparate zwischen einzeitigen und mehrzeitigen Verfahren. Einzeitige Verfahren sind nach ihrer Ansicht Frischpflanzenpräparate, die unmittelbar nach der Ernte durch Pressen, Verreiben und Ausziehen bis zum therapeutisch verwendbaren Arzneimittel verarbeitet werden. Solche Arzneizubereitungen haben neuerdings auch Eingang in die Therapie gefunden. Besonders bei glykosidhaltigen Pflanzen sollen sie im Gegensatz zu den alkaloidhaltigen Drogen vorteilhaft sein (Tschirsch).

Tabelle 5.

Präparat	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
Gemüserhabarber-Preßsaft	10	1,2	268 ± 8,7
	10	2,4	243 ± 7,6

Ein entsprechend hergestellter Rhabarberpreßsaft zeigte gute abführende Wirkungen in beiden benutzten Dosierungsbereichen. Auch dieses Verfahren ist also brauchbar und führt zu ähnlichen Werten wie bei der Anwendung wäßriger Extrakte aus der getrockneten Droge.

VI. Wäßrige Extrakte aus Gemüserhabarber.

Nach GÖLDLIN v. TIEFENAU[16] wirken im Vakuum bereitete Rhabarberextrakte bis zum Vierfachen stärker abführend als die übrigen Extraktionsverfahren, da die Wirkstoffe durch die Einwirkung höherer Temperaturen und stetiger Luftsauerstoffzufuhr nachteilig beeinflußt werden. Aus diesem Grunde wurden alle Extrakte, gleichgültig nach welchen Methoden sie gewonnen wurden, in einer Vakuumapparatur nach UBRIG[18] eingedampft.

Tabelle 6. *Wäßrige Spissumextrakte aus Gemüserhabarber.*

Aufarbeitungsmethode	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
DAB.-Mazerat	10	1,2	241 ± 12,5
	20	2,4	235 ± 3,4
Dekokt	10	2,4	228 ± 9,5
Evakulat nach KESSLER	10	2,4	267 ± 11,4
Perkolat	10	1,2	258 ± 18,9
	10	2,4	241 ± 3,2

Im einzelnen wurden als Extraktionsmethoden angewandt: das Mazerationsverfahren; dieses liefert nach GÖLDLIN besonders günstige Ausbeuten. Daneben kamen Dekokte, hergestellt nach dem DAB. 6., zur Anwendung. Bei diesen kann sich der Zutritt von Luftsauerstoff und die starke Erhitzung nachteilig auswirken, so daß bei der Dekoktbereitung von Glykosiddrogen eigentlich keine günstigen Wirkungen zu erwarten sind. Trotzdem zeigte gerade diese Verarbeitung sehr gute laxierende Effekte. Die Evakulation wurde nach KESSLER[19] durchgeführt. Bei diesem Verfahren ist der Luftsauerstoff völlig ausgeschaltet. Im Vergleich zu den anderen Werten lieferte es aber keine besonders günstigen Ergebnisse. Die Perkolation wirkte sich dagegen wieder besser aus. Der Mittelwert liegt jedenfalls in unmittelbarer Nähe der bei der Anwendung des Mazerations- oder Dekoktverfahren erreichten Wirkung. Allerdings übertreffen diese beiden Zubereitungsarten die Perkolation anscheinend noch ein wenig.

Vergleicht man mit diesen an Spissumextrakten gewonnene Ergebnisse die Wirkung der Siccumextrakte, so ergibt sich, daß trotz gleicher Extraktionsverfahren in der Regel das Siccumextrakt etwas schwächer wirkt. Nur mit dem Evakulat und dem Dekokt wurden etwa gleiche Wirkstärken erreicht.

Tabelle 7. *Wäßrige Siccumextrakte aus Gemüserhabarber.*

Aufarbeitungsmethode	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
DAB.-Mazerat	10	2,4	298 ± 8,8
Dekokt	10	2,4	237 ± 3,8
Evakulat nach KESSLER	20	2,4	252 ± 3,7
Perkolat	20	1,2	303 ± 7,5
	20	2,4	275 ± 8,3

VII. Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.

Neben den wäßrigen Extrakten wurden auch solche mit organischen Lösungsmitteln hergestellt. Diese besitzen teilweise ein spezifisches Extraktionsvermögen für Anthrachinonderivate. Durch Äther, Petroläther und Chloroform werden vor allem die freien Anthrachinone der Droge entzogen. Im Azeton, Alkohol und Isopropanol sind auch die glykosidisch gebundenen Anthrachinone enthalten.

Bei den Alkoholauszügen wurde das Mazerationsverfahren und eine Mikroextraktionsmethode angewandt. Das letztere Verfahren wurde auch bei den Petroläther-, Azeton- und Chloroformauszügen benutzt. Die Ätherextraktion erfolgte im Soxhlet. CZETSCH-LINDENWALD[8] berichtet über die Extraktion im Soxhlet, daß sie in Anbetracht der Temperaturempfindlichkeit von Glykosiddrogen ungeeignet ist und als Endprodukt meist trübe oder unwirksame Bereitung liefert. Bei der Ätherextraktion ist das Verfahren trotzdem anwendbar, weil die Temperatur durch Erhitzen auf dem Wasserbad so niedrig liegt, daß eine nachteilige Beeinflussung nicht zu erwarten ist.

Tabelle 8. *Siccumextrakte mit organischen Lösungsmitteln aus Gemüserhabarber.*

Aufarbeitungsmethode	Lösungsmittel	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
Mazerat	Äthylalkohol	19	1,2	278 ± 7,9
	,,	19	2,4	270 ± 8,9
Mikroextrakt	,,	10	1,2	277 ± 11,8
	,,	10	2,4	253 ± 9,9
	Isopropylalkohol	10	1,2	303 ± 13,8
	,,		2,4	292 ± 16,8
Soxhlet	Äther	10	1,2	294 ± 15,7
	,,	29	2,4	285 ± 11,9
Mikroextrakt	Petroläther	10	1,2	281 ± 9,9
	,,	10	2,4	283 ± 6,7
	Azeton	10	1,2	296 ± 14,2
	,,	10	2,4	285 ± 10,8
	Chloroform	10	1,2	305 ± 6,1
	,,	10	2,4	306 ± 7,7

Sichere abführende Wirkungen fanden sich nur bei den Äthylalkoholextrakten. Bei der Anwendung des Petroläthers ist die Wirkung nicht mehr eindeutig zu sichern, sie liegt allerdings gerade an der

Grenze der wirksamen Schwellenwerte. Man muß demnach wohl folgern, daß die Anthrachinone für die Wirkung nicht allein verantwortlich sind, da trotz ihrer Anreicherung im Lösungsmittel nahezu alle Versuche mit organischen Lösungsmitteln negativ ausfallen. Im Vergleich zu den wäßrigen Extrakten sind sie jedenfalls deutlich unterlegen.

VIII. Anthrachinonfreie Rhabarberpräparate.

Nach KROEBER[2] besitzen selbst Rhabarberpräparate, bei denen die Anthrachinone mit verdünnter Schwefelsäure und Chloroform zum weitaus größten Teil entfernt sind, laxierende Eigenschaften. Als Erklärung wird angenommen, daß bei dieser Behandlung des Rhabarberpulvers noch erhebliche Wirkstoffanteile in der Droge zurückbleiben. Außerdem sollen nach KROEBER neben den Anthrachinonen andere Inhaltsstoffe eventuell an der Wirkung beteiligt sein. Selbst nach der Behandlung der Droge, nach der von JERMSTAD[20] angegebenen Methode, bei der auch die nicht gebundenen Anthrachinone entfernt werden, sollen ihr noch gewisse Wirkungen anhaften. Jedenfalls scheinen Anthrachinongehalt und Wirkungsgrad nicht miteinander parallel zu gehen, so daß man aus diesen Versuchen schließen möchte, die Anthrachinone können nicht die einzigen Wirkfaktoren des Rhabarbers sein. Bei einer Nachprüfung der KROEBERschen Versuche kommt GÖLDLIN[16] fast zu dem gleichen Ergebnis. Er berichtet allerdings über eine deutliche Abschwächung der Wirkung, während KROEBER[2] den laxierenden Effekt unverändert fand. Erst eine Droge, aus der nach dem Verfahren von DAELS[21] die Anthrachinone völlig entfernt sind, zeigt bei einem Versuche an der Maus deutlich geringere Wirkungen.

In Anlehnung an diese Versuche von KROEBER[2] und GÖLDLIN[16] wurden verschiedene Gemüserhabarberdrogen nach vorangehender Hydrolyse mit Salzsäure der Extraktion im Soxhlet mit Äther und Chloroform unterworfen. Die Extraktion wurde so lange ausgedehnt, bis der Auszug, der aus dem Soxhlet abfloß, farblos war und die

Tabelle 9.

Aufarbeitungsmethode	Lösungsmittel	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
	Anthrachinonfreie Droge.			
Soxhlet	Äther	30	2,4	255 ± 10,2
	Chloroform	10	1,2	311 ± 8,1
	,,	10	2,4	335 ± 3,9
	Spissumextrakte aus anthrachinonfreier Droge.			
Soxhlet	Äther	20	1,2	339 ± 10,9
	,,	30	2,4	251 ± 11,6
	Chloroform	10	1,2	294 ± 14,2
	,,	10	2,4	283 ± 11,8

Bornträgersche Reaktion bei der Droge und im zuletzt abfließenden Lösungsmittel negativ ausfiel. Diese so bearbeitete Droge wurde getrocknet und im Tierexperiment ausgetestet.

Das Ergebnis der einzelnen Versuchsreihen ist allerdings nicht ganz einheitlich. Nach der Ätherextraktion wirkt der Drogenrückstand deutlich abführend. Das gleiche gilt für den wäßrigen Spissumextrakt, den man aus der zuvor mit Äther behandelten Droge gewinnt. Bei der Verwendung von Chloroform als Lösungsmittel beeinflußt dagegen die mit Chloroform extrahierte Droge die Darmpassagezeit nicht. Der wäßrige Spissumextrakt des mit Chloroform behandelten Präparates wirkt aber in höherer Dosis wiederum laxierend. Der Effekt ist allerdings sehr gering und gerade noch statistisch einwandfrei nachweisbar, da in diesem Falle die Differenz zur Norm unmittelbar mit dem dreifachen mittleren Fehler zusammenfällt (Differenz zur Norm $= 28{,}0 \pm 9{,}3$).

Nach dem Ausfall der chemischen Reaktion darf man wohl annehmen, daß der Drogenrückstand nach der Einwirkung von Äther bzw. Chloroform praktisch anthrachinonfrei ist. Die Anthrachinone können demnach nicht allein für die laxierende Wirkung des Rhabarbers in Frage kommen.

Das unterschiedliche Ergebnis nach der Vorbehandlung der Droge mit Äther bzw. Chloroform scheint darauf hinzuweisen, daß im Äther gewisse Wirkstoffe, die nicht zu den Anthrachinonen gehören, schlecht löslich sind. In Chloroform können sie aber anscheinend zusammen mit den Anthrachinonen besser übergehen. Daher wirkt der Drogenrückstand nach der Chloroformeinwirkung geringer als das mit Äther behandelte Präparat. Unter Umständen bleibt sogar jeder Einfluß auf die Darmpassagezeit aus. Es bleibt allerdings erstaunlich, daß der Chloroformextrakt (s. Tabelle 8), von dem eigentlich erwartet werden könnte, daß er die Anthrachinone in angereicherter Form enthält, im Tierversuch ohne Wirkung blieb. Für diese Beobachtung ließ sich bisher keine Erklärung finden.

IX. Totalextrahierte Rhabarberpräparate.

Nach Mühlemann und Scherrer[15] enthalten selbst wäßrige Extrakte vom offizinellen Rhabarber eine starke Wirksamkeit, wenn die Droge zuvor mit Äther, Chloroform, Azeton und Methylalkohol erschöpfend extrahiert worden ist. In Anlehnung an diese Arbeiten wurde der Gemüserhabarber den gleichen Arbeitsmethoden unterworfen und die so gewonnenen Präparate der tierexperimentellen Prüfung zugeführt.

Das Ergebnis in den einzelnen Versuchsreihen war ziemlich wechselnd. Insgesamt ist also eine sichere abführende Wirkung nicht

Tabelle 10.

Aufarbeitungsmethode	Lösungsmittel	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
		Totalextrahierte Droge.		
Soxhlet	Äthylalkohol	50	1,2	295 ± 8,1
		50	2,4	287 ± 12,6
		Spissumextrakte totalextrahierter Droge.		
Soxhlet	Äthylalkohol	20	1,2	278 ± 13,2
		20	2,4	277 ± 13,8

abzulesen. Unterwirft man eine derart behandelte Droge wäßrigen Extraktionsmethoden, so zeigt sich dagegen im Tierversuch noch eine leichte Beschleunigung der Darmpassage. Es scheint sich somit zu bestätigen, daß in das wäßrige Milieu gewisse Bestandteile übergehen, die offenbar nicht zu den Anthrachinonen gehören, die aber an dem Gesamteffekt des Rhabarbers und an dem Zustandekommen der abführenden Wirkung beteiligt sind.

X. Gerbstofffreie Rhabarberpräparate.

Bekanntlich ist im Rhabarber neben Anthrachinon noch Gerbstoff in größerer Menge vorhanden. Dieser wirkt der abführenden Wirkung entgegen. Es ist daher denkbar, daß durch eine Entfernung der Gerbstoffe eine Verstärkung des laxierenden Effektes erreicht bzw. eine Anreicherung und Konzentrierung der Wirkstoffe ermöglicht wird. Zur Klärung dieser Frage wurden zunächst dem Rhabarberextrakt die Gerbstoffe mit Hühnereiweiß entzogen. Außerdem wurde in Analogie zu den Versuchen mit Frangula von Casparis und Maeder[22] ein wäßriges Perkolat mittels Gerbstoffällung durch Bleisalz aufgearbeitet. Analoge Versuche stellte Siegrist[23] mit offizinellem Rhabarber an, wobei er im Gegensatz zu den Ergebnissen an Frangula keine Anreicherung an Wirkstoffen erreichte. Das Perkolat wurde mit Bleiazetat und Bleiessig bis zur vollständigen Fällung versetzt und filtriert. Der Filtrationsrückstand, der die Gerbstoffe enthielt, wurde mit Wasser gewaschen und getrocknet und anschließend mit Alkohol bzw. mit Wasser extrahiert. Diese verschiedenen Extrakte wurden am Tier geprüft.

Außerdem wurde das Filtrat der Bleisalzfällung an der Ratte untersucht. Hierzu wurde das Filtrat zur Entfernung des Bleis mit Schwefelwasserstoff versetzt, anschließend die Bleisulfidfällung abfiltriert und der verbleibende Rest nach Einengung im Vakuum zum Spissumextrakt eingedampft.

Bei der Gerbstoffällung mit Hühnereiweiß führten erst Dosen von 5 und 10 mg zu einer beschleunigten Darmentleerung, d. h. also, unter diesen Bedingungen werden gleichzeitig mit dem Gerbstoff auch andere

Tabelle 11. *Gerbstofffreie Extrakte.*

Aufarbeitungsmethode	Anzahl der Tiere	Dosis mg/100 g	Mittelwerte in Minuten
I. Gerbstoffällung mit Eiweiß.			
Spissumextrakt	10	1,2	309 ± 16,2
	17	2,4	304 ± 12,8
	10	5,0	237 ± 9,7
	9	10,0	236 ± 9,6
II. Gerbstoffällung mit Bleiazetat.			
1. Rückstand:			
a) Perkolat, Äthanolextrakt	10	1,2	264 ± 14,9
	10	2,4	252 ± 13,6
b) Dekokt, wäßriger Extrakt	10	1,2	229 ± 3,8
	10	2,4	223 ± 6,5
2. Filtrat:			
a) Spissumextrakt	10	1,2	274 ± 19,0
	10	2,4	252 ± 15,9

Wirkstoffe ausgefällt. Bei der Bleiazetatfällung des Gerbstoffes kam es dagegen zu einer gewissen Verstärkung des Abführeffektes, so daß selbst Dosen von 1,2 mg deutliche Wirkungen anhaften. Trotzdem bieten die vorliegenden Ergebnisse keinen sicheren Anhaltspunkt dafür, daß eine entscheidende Anreicherung der Wirkstoffe unter diesen Bedingungen gelingt; insbesondere ist aus ihnen nicht zu ersehen, wie die Anreicherung am besten durchzuführen ist, da sowohl der Rückstand wie das Filtrat etwa gleichartige pharmakologische Effekte auslösen.

Besprechung der Ergebnisse.

Untersuchungen an Ratten sind brauchbar als Test, um Drogen aus der Reihe der anthrachinonhaltigen Laxantien auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Man muß allerdings berücksichtigen, daß die Tiere im Laufe des Jahres gewisse Empfindlichkeitsschwankungen aufweisen und besonders in den Sommermonaten verkürzte Darmpassagezeiten auftreten.

Die Stärke der abführenden Wirkung ist bei den anthrachinonhaltigen Abführmitteln offenbar nur bedingt von der Dosierung abhängig. Mit der Überschreitung der unteren wirksamen Grenzkonzentration wird im allgemeinen ein etwa gleich starker abführender Effekt erzielt, wie mit höheren Dosen. Auch bei einer Steigerung der Rhabarbergabe bis auf das Achtfache wurde der Darminhalt nicht schneller entleert als von der gerade noch wirksamen unteren Dosis. Dies gilt sowohl für die offizinellen Rhabarbersorten wie für den einheimischen Gemüserhabarber.

Alle geprüften Sorten zeigen dabei eine weitgehend gleichförmige Wirkung. Dies gilt besonders für die Wirkungsintensität, wenn man sie vergleichend an den unteren Grenzschwellendosen mißt. Jedoch zeigt der Gemüserhabarber in der Regel etwas schwächere Wirkkraft,

so daß etwa die doppelte Menge im Vergleich zu dem offizinellen Rhabarber benötigt wird. Außerdem bleibt auch die Ausscheidungsgeschwindigkeit etwas hinter der der offizinellen Drogen zurück.

Im übrigen sind zwischen den verschiedenen Sorten des offizinellen Rhabarbers keine erheblichen Differenzen in der Wirkungsintensität nachweisbar. Das gleiche gilt auch für den Gemüserhabarber verschiedener Provenienz, so daß innerhalb dieser beiden Gruppen weitgehende Übereinstimmung besteht.

Bei den verschiedenen Gemüserhabarbersorten bewegt sich der Gehalt an Anthrachinonglykosiden etwa in der gleichen Größenordnung. Es ist allerdings merkwürdig, daß gerade die Sorte Rheum undulatum Holländer (Rh IV), wenn man schon quantitative Vergleiche über den Anthrachinongehalt anstellt, die geringsten Mengen an diesen Wirkstoffen enthält. Bei der Prüfung am Tier führt sie dagegen zu einer stärkeren Beschleunigung der Darmentleerungszeit und ist offensichtlich den anderen Vergleichssorten etwas überlegen. Diese Beobachtung deutet bereits darauf hin, daß man nicht in den Anthrachinonen den alleinigen Träger der Wirkung sehen darf und daß andere Inhaltsstoffe am Zustandekommen des laxierenden Effektes beteiligt sein können. Die übrigen Bestandteile der Droge zeigen bei den 4 geprüften Gemüserhabarbersorten starke Schwankungen ihres Inhaltes. Dies gilt für Zucker, Kohlenhydrate, Rohfaser, Aschegehalt und Schleimstoffe (HOLTZEM[24]).

Von den angewandten Aufbereitungsverfahren werden bei der Herstellung wäßriger Spissumextrakte die stärksten abführenden Effekte erzielt. Selbst bei völliger Beseitigung der Anthrachinonderivate entfaltet der wäßrige Auszug immer noch relativ gute Wirkungen. Es müssen demnach in den wäßrigen Auszug noch andere Wirkstoffe übergehen, deren Natur allerdings bei den angewandten Anreicherungsverfahren nicht geklärt werden konnte.

In bezug auf Entfernung der Anthrachinonderivate aus der Droge unterscheiden sich die einzelnen organischen Lösungsmittel deutlich. Die Alkoholauszüge wirken noch abführend, die anderen liegen dagegen im Vergleich zu den wäßrigen Extrakten in ihrer Wirkstärke weit zurück, so daß bei einer statistischen Auswertung kein sicherer Effekt nachweisbar ist.

Auch bei Fällung der Gerbstoffe mit Eiweiß ist eine Verstärkung des laxierenden Effektes nicht zu erreichen. Da mit der Gerbstoffällung offenbar auch die eigentlichen Abführstoffe entfernt werden, wirken diese Extrakte relativ schlecht. Infolgedessen führen die üblichen Dosen nicht ab, so daß erst mit höheren Gaben die Beschleunigung der Darmpassage erreicht wird. Der Versuch nach der Fällung des Gerbstoffes die eigentlichen Wirkstoffe durch Bleiazetat anzureichern, bietet keine Möglichkeit zu einer besonders wirksamen Fraktion zu kommen.

Zusammenfassung.

In Versuchen an Ratten wurde die abführende Wirkung offizineller und deutscher Rhabarbersorten geprüft. Als Test diente die Ausscheidungsgeschwindigkeit von Bariumbrei, der per os gleichzeitig mit dem Rhabarber zugeführt wurde.

Es bestehen deutliche Unterschiede in der Ansprechbarkeit der Tiere während der verschiedenen Jahreszeiten.

Im Vergleich zum offizinellen Rhabarber ist der Gemüserhabarber etwas schwächer wirksam. Dies zeigt sich in der benötigten Dosis und der Ausscheidungsgeschwindigkeit für Bariumbrei. Die Stärke der abführenden Wirkung nimmt selbst beim offizinellen Rhabarber mit höherer Dosierung nicht im Verhältnis zum Anstieg der Dosis zu. Die einzelnen Sorten verhalten sich beim offizinellen und deutschen Rhabarber im allgemeinen ziemlich gleichartig.

Die stärksten abführenden Wirkungen sind mit wäßrigem Spissumextrakt zu erzielen. Selbst nach der Entfernung der freien und glykosidisch gebundenen Anthrachinone beschleunigen die wäßrigen Auszüge noch die Darmpassage. Die Anthrachinone können somit nicht allein für die abführende Wirkung verantwortlich sein. Eine Anreicherung der übrigen Wirkstoffe und eine Klärung ihrer Natur konnte nicht erreicht werden.

Literatur.

[1] Wallach: Arch. Pharmac. **279**, 393 (1941). — [2] Kroeber: Schweiz. Apoth.ztg **61**, 222 (1923). — Heil- u. Gewürzpfl. **6**, 41 (1923/24), zit. nach Wallach; **5** (1924). — Pharmaz. Z.halle Dtschld **65**, 25 (1924). — Casparis u. Göldlin v. Tiefenau: Schweiz. Apoth.ztg **1923**, Nr 31, 32, 35, 37, 38. — [4] Führer: Arch. exper. Path. (D.) **105**, 249 (1925). — Führer u. de Dios Fernandez: Arch. exper. Path. (D.) **124**, 185 (1927). — [5] Himmel-Baur u. Walter: Biol. gen. (l.; Ö.) **5** (1929). — [6] Wasicky: Physiopharmakonosie, S. 310. Wien 1932. — [7] Schlemmer u. Gentner: Arch. Pharmaz. **278**, 252 (1940). — [8] Czetsch-Lindenwald: Die deutsche Heilpflanze, Bd. 9, S. 99. 1943. — Pflanzliche Arzneizubereitung, 2. Aufl. Stuttgart 1945. — [9] Cannon: The mechanical factors of digestion. London 1911. — Magnus: Verh. inn. Med. u. Kinderhk. **29**, 42 (1912). — [10] Straub u. Gebhardt: Arch. exper. Path. (D.) **181**, 399 (1936). — [11] Jaretzky: Die deutsche Heilpflanze, Bd. 9, S. 61, 73, 86, 110. 1943. — [12] Schlaginweit: Münch. med. Wschr. **1927**, 671. — [13] Loewe u. Faure: Arch. exper. Path. (D.) **107**, 272 (1925). — [14] Walter: Diss. Tübingen 1939. — [15] Mühlemann u. Scherrer: Pharmac. Acta Helv. **1941**, 169. — [16] Göldlin v. Tiefenau: Diss. Basel 1924. — [17] Schenk, Lucass u. Wegener: Allgemeine Heilpflanzenkunde. 1927. — [18] Ubrig: Dtsch. Apoth.ztg **46**, 311 (1931). — [19] Kessler: Süddtsch. Apoth.ztg **1935**, Nr 42. — [20] Jermstad: Schweiz. Apoth.ztg **1920**, H. 7. — [21] Daels: J. Pharmacie Belg. **1**, 198 (1919). — [22] Casparis u. Maeder: Diss. Basel 1925. — [23] Siegrist: Diss. Basel 1932. — [24] Holtzem: Diss. Bonn 1948. — Pharmacie (im Druck).

Aus dem Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der früheren Universität Breslau (Direktor: Prof. Dr. O. Eichler).

Versuche zum Schutz gegen leberschädigende Gifte.

Von

O. Eichler und M. Hahn.

(Eingegangen am 11. Oktober 1948.)

Die Gefährdung der Leber nimmt bei einem immer größeren Kreis von Menschen zu. Das gilt sowohl hinsichtlich der Therapie mit chemotherapeutischen Substanzen und zahlreichen anderen Medikamenten als auch der Industrie, in deren Produktionsgang immer leberschädigende Gifte auftreten.

Über die Wichtigkeit eines Leberschutzes ist man sich einig und glaubt im Traubenzuckerinsulin, in Aneurin und Nikotinsäureamid und ähnlichem eine gewisse, aber wohl nicht immer ausreichende Hilfe zu besitzen. Kürzlich wurde Methionin als Schutzstoff gegen Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff angewandt[1]. Den Kreis der Möglichkeiten zu erweitern, ist daher nicht nutzlos. Dies war unser Bestreben in den folgenden mitgeteilten Versuchen, die nicht auf gewohnten Wegen fortschritten.

Da man nicht weiß, an welcher Stelle die Schädigung einsetzt und wie sie im einzelnen abläuft, ist man gezwungen, nach dem Prinzip der Stimmgabel zu verfahren. Man schlägt an und hört auf den Ton. Dies Verfahren — in der Auffindung der Chemotherapeutika ganz gewöhnlich — verlangt Ausdauer und Glück.

Wir hofften in zweierlei Hinsicht einen Anhalt zu besitzen.

1. Das Unbekannte wurde gesucht in der Pflanzenwelt;

2. glaubten wir eine gewisse Auswahl zu besitzen in Medikamenten, die die Volksmedizin und Homöopathie für Leberkrankheiten empfiehlt, zumal sich diese Indikation zumeist bereits in der älteren Medizin findet.

Als Test stand uns die mit Tetrachlorkohlenstoff oder Trinitrotoluol vergiftete Ratte zur Verfügung.

Methodik.

Die Tiere wurden in parallelen Gruppen mit Tetrachlorkohlenstoff oder Trinitrotoluol behandelt, aber einige Tage vor der ersten Injektion wurde auch schon eine prophylaktische Zufuhr des zu prüfenden

[1] Beattie, J., P. H. Herbert, C. Wachtel u. C. W. Steele: Brit. med. J. **1944** I, 209. Ref. Chem. Zbl. **1944** II, 449.

Pflanzenextraktes begonnen. Die Leberfunktion wurde mit der Methode von FELIX und TESKE geprüft, die gerade bei sehr schwachen Leberstörungen brauchbar ist. Dann erfolgte die Kontrolle des Bilirubinspiegels im Blut nach der Methode von JENDRASSIK und GROF[2], über die BARFUSS † und HAHN[3] einige methodische Modifikationen bei Anwendung des photoelektrischen Kolorimeters demnächst mitteilen werden. Auf diese Publikation ist zu verweisen.

1. Versuche mit Chelidonium majus.

Schöllkraut findet in der homöopathischen Indikationstabelle eine besondere Beziehung zur Leber[4], und zwar zu Leberkrankheiten der verschiedensten Art. Wenn die Empfehlung auf Gallensteinkoliken lautet oder teilweise beschwerlichen Stuhlgang, dann wird man eine derartige Wirkung dem spasmolytischen Chelidonin zuschreiben wollen. Indikationen wie Gelbsucht und vor allem Fettleber lassen eine Organwirkung vermuten, vorausgesetzt, daß es überhaupt zur Wirkung kommt.

Ein ausreichender Beweis für eine therapeutische Wirkung des Schöllkrautes an der Leber liegt kaum vor. Die Pflanze findet sich als bevorzugtes Lebermittel bei PARACELSUS, wobei die Signatur der gelben Blüte und des gelben Saftes eine Rolle spielt. Damit ist aber die Schöllkrautfrage nicht abgetan. Die Anwendung gegen Gelbsucht läßt sich bis GALEN und DIOSKURIDES zurückverfolgen und ist sicher noch wesentlich älter. Dafür sprechen auch alte Volksnamen verschiedener Länder. Außerdem hat VOLLMER[5] vor kurzem darauf hingewiesen, daß bei PARACELSUS die Signaturenlehre vielfach vorwiegend nur zur Deutung bekannter Anwendungen verwendet wird. Da die alten Angaben ohne Überprüfung bis in die Neuzeit geschleppt wurden, kommt der häufigen Nennung als Lebermittel keine Bedeutung zu. Schöllkraut spielt in neuerer Zeit eine wesentliche Rolle bei HUFELAND, RADEMACHER und HAHNEMANN, und in neuester Zeit erschien außer einzelnen Berichten eine Monographie von DANIEL und SCHMALTZ[6]. Die klinischen Angaben von DANIEL in derselben bringen einen allgemeinen Eindruck, aber keinen Beweis einer therapeutischen Wirkung. Daß eine gallentreibende Wirkung nicht vorhanden ist, zeigte URBAN[7]. Eine tödliche Schöllkrautvergiftung beim Menschen[8] mit acholischem Stuhl und fettiger Degeneration der Leber und die Lebervergrößerung

---

[2] JENDRASSIK, L. u. P. GROF: Biochem. Z. **297**, 81 (1938). — [3] BARFUSS, F. u. M. HAHN: Erscheint demnächst. — [4] MÜLLER, C.: Charakteristik der wichtigsten homöopathischen Arzneimittel, S. 51. Leipzig 1935. — [5] VOLLMER, H.: Klin. Wschr. **1943**, 393. — [6] DANIEL, K. u. D. SCHMALZ: Das Schöllkraut. Stuttgart 1939. — [7] URBAN, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **195**, 43 (1940). — [8] KOOPMANN, H.: Slg. Vergift.fälle, A 8, 93 (1937).

vergifteter Kaninchen[7] zeigen aber, daß ein Angriffspunkt an der Leber vorhanden ist[9].

Aus diesen Angaben ist ersichtlich, daß unsere Fragestellung eine Grundlage besaß.

Es wurden zuerst Tiere herangezogen, die mit Trinitrotoluol vergiftet worden sind (siehe [10]). Folgende Gruppen wurden in den Versuch genommen.

Gruppe I. 15 Tiere. Jede Ratte im Gewicht von 200—300 g erhielt jeden 2. bis 3. Tag 1 cm³ der homöopathischen Urtinktur* von Chelidonium zugeführt. Der Alkohol war im Vakuum bei 37° abdestilliert worden, der Rückstand wurde in 1 cm³ H_2O aufgenommen. Die Behandlung begann am Tage vor der Zufuhr von 150 mg/kg Trinitrotoluol (4. 9. 43).

Ausscheidung von Brenztraubensäure normal . . . . . 14,8 ± 1,5
29. 9. Funktionsprobe . . . . . 15,8 ± 1,0
9. 10. Trinitrotoluol 100 g/kg.
7. 10. Leberfunktion . . . . . 12,0 ± 1,7
6. 11. 150 mg, 17. 11. 100 mg, 23. und 29. 11. 100 mg/kg Trinitrotoluol. Es überleben 4 Tiere; Ausscheidung . . . 6,7 ± 1,7
Prüfung des Blutstatus im Durchschnitt vor und nach der ersten Gabe von Trinitrotoluol
normal 91% Hb, 7,7 Mill. Erythrozyten, 0,6 Färbeindex;
nachher 81% „ , 6,6 „ „ , 0,62 „ .

Die im Abstand von 2—3 Tagen erfolgende Behandlung mit Chelidonium hatte keine sichtbar schützende Wirkung ausüben können.

Gruppe II. Werte nur zur Kontrolle in derselben Art mit Gift behandelt. Den allgemeinen Verlauf haben wir schon früher dargelegt[10]. Hier fügen wir nur den durchschnittlichen Blutstatus bei, vorher und 1 Monat nach der ersten Injektion

normal 90% Hb, 8,1 Mill. Erythrozyten, 0,62 Färbeindex;
geschädigt 70% „ , 6,0 „ „ , 0,59 „ .

Gruppe III. 10 Tiere. Die Behandlung mit Chelidonium wie in Gruppe I begann nach der ersten Injektion von Trinitrotoluol. Die Bedingungen waren also schwerer als in Gruppe I. 4 Leberfunktionsproben ergaben hintereinander folgende Ausscheidungen: 23,4 (normal), 15,7, 17,7, 12,5%.

Das Blutbild wurde hier noch der ersten und zweiten Schädigung geprüft und ergab folgende Werte:

1. Schädigung 83% Hb, 6,5 Mill. Erythrozyten, 0,65 Färbeindex;
2. „ 69% „ , 5,0 „ „ , 0,7 „ .

Gruppe III a. Diese Gruppe bestand nur aus 5 Tieren und wurde mit einem Chelidoniumdekokt behandelt, der aus selbst in der Nähe des Instituts gesammelten Pflanzen hergestellt wurde. Die Mißerfolge waren die gleichen.

Gruppe IV, bestehend aus 5 Tieren, wurde täglich mit 2 cm³ der Chelidonium-Urtinktur (aufgenommen in 1 cm³ H_2O) behandelt, die ähnlich vorbereitet wurde

[9] Die Angaben dieses Abschnittes und einige Angaben bei den anderen Pflanzen verdanken wir dem Einblick in ein umfangreiches, im Druck befindliches Arzneipflanzenbuch von H. Vollmer. — [10] Eichler, O. u. M. Hahn: Erscheint zugleich.

* Die Urtinktur lieferte uns die Firma Dr. Willmar Schwabe, Leipzig. Wir danken Herrn Dr. Neugebauer für die Herstellung.

wie bei Gruppe I. Das Resultat war unerwartet. Die Ausscheidungswerte betrugen 21,0 (normal), 14,6, 11,6, 13,1%. Das Hämoglobin nahm hier kaum ab. Jedoch zeigte das histologische Bild dieselbe Art von Leberschädigung wie bei den anderen Tieren. Die von uns benutzte Dosierung war offenbar zu hoch, und man wird sich die Frage vorlegen, ob in den bisher vorgelegten Versuchen der Mißerfolg durch zu hohe Dosierung verursacht wurde, wenn sie auch nicht ganz die der Gruppe IV erreichte. Im übrigen bedeutet unser Befund nur eine Erweiterung der oben aus der Literatur mitgeteilten Erfahrung bei Mensch und Kaninchen. Bemerkenswert ist, daß die Leberschädigung sich nicht zu der des Trinitrotoluols addierte, was wir wohl als Zeichen dafür auffassen dürfen, daß die 2—3mal seltenere Dosierung schon die direkt toxische Wirkung ausschließt.

Wir haben die Versuche mit Tetra als Lebergift wiederholt und die Dosis auf die Hälfte reduziert. Der Versuch verlief mit je 5 Ratten in jeder Gruppe hier folgendermaßen:

a) 25. 1. Je Tier erhielt 1 cm³/kg Tetra subkutan + $^1/_2$ cm³ Chelidonium Urtinktur, 26. 1. nur $^1/_2$ cm³ Chelidonium-Urtinktur, 28. 1. wie am 25. 1., 29. 1. wie am 26. 1., 31. 1. wie am 25. 1.

b) Die Kontrollgruppe wurde, abgesehen der Gabe von Chelidonium, genau so behandelt. Die Resultate sind:

a) vorher 9,2% Ausscheidung steigt auf 15,1% (69% Steigerung),
b) „ 5,9% „ „ „ 16,7% (183% „).

Eine einfache Rechnung nach Prozent würde auf einen therapeutischen Effekt schließen lassen. Jedoch sind die Werte in keiner Weise signifikant. Den unter b) gegebenen Wert als Grundlage mit der weiteren Entwicklung einfach in Beziehung zu setzen, ist nach unserer früheren Korrelationsrechnung[10] nicht statthaft.

Wir haben deshalb die Versuche mit je 10 Tieren in der Gruppe wiederholt. Die erste Injektion von Chelidonium erfolgte 4 Stunden vor der ersten Gabe von Tetra. Die Tiere wurden nach der ersten Normalprüfung so geordnet, daß der Durchschnitt vor der Behandlung in beiden Gruppen 9,5 ± 1,6 bzw. ± 1,7 betrug. Nach der Vergiftung betrug die Ausscheidung in den Kontrollgruppen 14,2% (± 1,4), in der behandelten Gruppe 15,1% (± 1,7). Ein Unterschied war nicht signifikant. Derselbe Zyklus der Behandlung mit 3 Injektionen des Giftes wurde wiederholt. Eine weitere Leberfunktionsprobe ergab jetzt die Werte 15,5% (± 0,7) bei den behandelten, und 13,1% (± 1,0) bei den unbehandelten Tieren. Die Histologie zeigte keine Unterschiede. Also auch hier fehlt ein Anzeichen von günstigem Effekt.

Ein dritter Versuch mit einer Gruppe von 5 Tieren, die nur einmal mit Tetra und am Tage vorher und nachher je $^1/_2$ cm³ Chelidonium erhalten hatten, zeigte auch einen Anstieg der Ausscheidung von 11,2 auf 14,5% 8 Tage nach der Vergiftung.

In allen diesen Modifikationen ließ sich also jede Wirkung auf den Vergiftungsablauf vermissen.

2. Cnicus benedictus (Carduus benedictus): = Benediktendistel.

Diese Pflanze findet sich bei Lebererkrankungen als Therapeutikum nur selten angegeben. Auch in Frankreich, wo pflanzliche Lebermittel, vor allem aus den Familien der Compositae und Labiatae eine größere Rolle spielen, ist eine entsprechende Anwendung unserer Komposite kaum bekannt[11]. Meist liegt die Anwendung auf der Linie der Verordnung des Bitterstoffs Cnicin. Für die Einbeziehung dieser Droge in unsere Untersuchungen war eine Angabe maßgebend[12], wonach sie besonders reich an Nikotinsäureamid sein sollte. Diesem wird eine Leberschutzwirkung zugeschrieben[13].

Folgende Versuchsvarianten wurden probiert zuerst bei 3 Gruppen von je 7 Tieren:

Gruppe 1. 3 Tage hintereinander wurden je 1 cm^3 der Urtinktur subkutan gegeben, am 4. Tage zugleich mit 2 cm^3/kg Tetra.

Gruppe 2. 2 cm^3 der Urtinktur in Wasser aufgenommen, wurden 2 Stunden vor derselben Gabe von Tetra geschaltet, an den 3 folgenden Tagen wurden je 1 cm^3 Carduus benedictus gegeben.

Gruppe 3 erhielt nur Tetra.

Die Funktionsprüfung fand 8 Tage darauf statt. Die Resultate der Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure ergaben kurz:

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Vorher	4,6	4,6	4,5
Nachher	13,5 $\pm$ 1,7	17,9 $\pm$ 1,3	12,5 $\pm$ 1,2

In einer zweiten Serie von wiederum 3 Gruppen von je 7 Tieren wurde Vorbehandlung und Nachbehandlung länger ausgedehnt, die Dosis halbiert. Das Resultat war nicht besser, ebensowenig bei einer dritten Funktionsprüfung nach neuer Schädigung. Wir haben noch einen Versuch bei nur 1 cm^3 CCl_4/kg, so daß die Bedingungen noch günstiger waren. Bei allen unseren Versuchsanordnungen konnten wir schließlich keinen Effekt nachweisen.

3. Chelone glabra.

Eine Droge, die auch in der Volksmedizin bei Leberkrankheiten Anwendung findet.

---

[11] Cholagoge Wirkung ist für eine ganze Reihe von Korbblütern, z. B. die Artischocke und den Löwenzahn, nachgewiesen, u. a. von E. Chabrol u. Mitarb.: C. r. Soc. Biol. **108**, 1020, 1100 (1931). Unsere Pflanze ist bezeichnenderweise nicht unter den geprüften, obwohl sie als Amarum in Frankreich häufiger verwendet wird. Madaus berichtet in seinem bekannten Buch über eine Verwendung als Lebermittel in Ungarn. — [12] Rolleri, F.: Arch. Pharmaz. **281**, 118 (1943). — [13] Siehe Beiglböck, W. u. A. Spiess-Bertschinger: Klin. Wschr. **1943**, 249. — Z. klin. Med. **143**, 563 (1944).

In den Versuchen wurde von jetzt ab folgende Änderung der Versuchsanordnung getroffen.

Die Dosis der p-Oxyphenylbrenztraubensäure wurde auf 30 mg herabgesetzt. Die durchschnittliche normale Ausscheidung ging jetzt auf 4—6% zurück.

Dann wurden jetzt nicht mehr wie bisher die Einzelurine untersucht, sondern je 5 Ratten in einen Käfig zusammengesetzt und nur die Durchschnittswerte ermittelt.

Im übrigen war weder funktionell noch histologisch ein Effekt der Therapie und Prophylaxe zu bemerken.

4. Silybum Marianum (Carduus marianus) = Mariendistel.

In der homöopathischen Indikationsliste[14] dieser Droge (die Tinktur wird aus dem Samen hergestellt) finden sich angegeben: hepatogene Dyspepsie, Leberstauung, Hepatitis parenchymatosa, Ikterus. Die Pflanze, wie Cnicus benedictus eine Komposite, fand und findet auch außerhalb der Homöopathie als Lebermittel Verwendung. Wenn das Syllibum des Plinius mit ihr identisch ist[15], was wahrscheinlich ist, so wurde damals eine cholagoge Wirkung angenommen („praecipue bilem trahit"). Nennenswerte Bedeutung hat eine entsprechende Anwendung trotz einiger Angaben in der Literatur (z. B. Tabernaemontinus 1731) aber bis zu Rademacher nicht besessen. Seit der Empfehlung für verschiedene Erkrankungen der Leber und der Gallenwege durch Rademacher erwähnen verschiedene Autoren auch außerhalb der Homöopathie günstige Beobachtungen, aber auch hier liegt kein Beweis für eine Wirkung vor. Hahnemann hat die Pflanze abgelehnt, weil die Anwendung bei Seitenstechen auf Signatur beruhe. Von den Inhaltstoffen wissen wir nicht viel mehr als daß die Pflanze Tyramin, einige andere biogene Amine, Gerbstoff und „Bitterstoff" enthält[16]. Eine pharmakologische Untersuchung liegt bisher nicht vor.

1. Versuch. In der Gruppe befinden sich 5 Tiere. Am 1. Tage erhielten die Tiere $^1/_2$ cm³ der Urtinktur, am folgenden 1 cm³ Tetrachlorkohlenstoff und am 3. Tage wiederum die Droge wie am 1. Tage. 8 Tage später erfolgte die Leberfunktionsprüfung. Die Ausscheidung stieg von 3,8 auf 9%. Da jedoch 4 Parallelgruppen mit genau derselben Dosierung Tetra Anstiege auf 11,2, 14,5, 14,0 und 12% zeigten, hielten wir eine gründlichere Prüfung für geboten.

2. Versuch. 4 Gruppen von je 5—6 Tieren wurden angesetzt.

Gruppe I erhielt $^1/_2$ cm³ Carduus mar. subkutan, ebenso am übernächsten Tage, am 4. Tage erfolgte die Vergiftung mit 1 cm³ Tetra je Kilogramm, am nächsten Tage wurde noch eine letzte Drogeninjektion vorgenommen.

Gruppe II erhielt nur Tetra.

[14] Schoeler, H.: Komp. der wissenschaftlichen und praktischen Homöopathie. — [15] Marzell, H.: Sudhoffs Arch. 32, 94 (1939). (Histor. Ausführungen über Silybum marianum.) — [16] Ullmann, A.: Biochem. Z. 128, 402 (1922).

Gruppe III wurde wie Gruppe I behandelt, jedoch als Lebergift wurden 100 mg/kg Trinitrotoluol zugeführt.

Gruppe IV erhielt nur Trinitrotoluol.

Die Ausscheidungswerte in Prozent gibt folgende Tabelle, und zwar wird immer vor jeder Leberfunktionsprobe eine neue Vergiftung wie unter 1 vorgenommen. Die dritte Funktionsprobe erfolgte jedoch in Gruppe I und II nach 3maliger Behandlung mit Tetra, mit zwischengeschalteter Droge. Gruppe III und IV erhielten nur einmal Trinitrotoluol, die Medikation wurde aber 6mal wiederholt.

Gruppen Nr.	I	II	III	IV
Normal	4,0	5,0	7,6	10,3
Nach 1 Schädigung .	1,7	4,3	4,8	8,3
Nach 2. Schädigung .	7,6	8,0	8,6	10,6
Nach 3. Schädigung .	8,3	10,7	10,3	20,3
Bilirubin mg-% . . .			0,19	0,31

Während die Ausschläge bei den ersten beiden Gruppen nicht signifikant sind, ist das doch in den beiden letzten sehr naheliegend.

Da sich bei uns und auch nach den Angaben von Krarup[17] die *Bilirubin*bestimmung im Serum als eine sehr gute Methode erwiesen hat, wurden noch Bestimmungen im Serum nach der oben erwähnten Methodik angeschlossen. Wir sehen in der Tabelle die Durchschnittszahlen der beiden letzten Gruppen.

Für Tetra wurde noch ein extra Versuch angesetzt. Gruppe I nach Vor- und Nachbehandlung mit Carduus marianus. Gruppe II erhielt an 2 Tagen je 2 cm^3 Tetra subkutan.

3 Tage später fand die Bilirubinbestimmung statt, die folgende Einzelzahlen ergab (in mg-%):

Gruppe I	0,12	0,04	0,04	0,005	0,05	Durchschnitt	0,05
,, II	0,08	0,02	0,17	0,14	0,3	,,	0,14

In beiden Fällen haben wir hier eine deutliche Wirkung, und zwar immer in der Richtung, daß man einen therapeutischen Effekt annehmen muß. Wenn wir jetzt die histologischen Bilder damit vergleichen, dann können wir keinen einwandfreien Unterschied feststellen. Immerhin ist der Ansatz ausreichend, um den Weg als aussichtsreich erscheinen zu lassen. Versuche, auch Leberglykogen und Fettstoffwechsel zu untersuchen und vor allem ob der Schutz auch tödliche Effekte betrifft, sind im Gange.

5. *Xanthin.*

Xanthin wurde von uns herangezogen, weil Forbes und Mitarbeiter[18] durch Xanthin eine Tetrachlorkohlenstoffvergiftung durch Prophylaxe

[17] Krarup, N. B.: Klin. Wschr. **1943**, 401. — [18] Forbes, J. C. u. Mitarb.: J. Pharmacol. (Am.) **58**, 402 (1936); **65**, 287 (1939).

und Therapie soweit beeinflussen konnten, daß eine Schädigung der Leber im histologischen Bild nicht zu beobachten war, während die in gleicher Art behandelten Kontrollen schwerste Störungen zeigten.

Wir haben auf das histologische Bild nur sekundären Wert gelegt — wie sich schon aus der Dosierung ergibt — und wollten funktionelle Beeinflussungen nachzuweisen versuchen.

Da Xanthin schwer löslich ist, mußten wir zur subkutanen Injektion Suspensionen bereitstellen.

Eine abgewogene Menge Xanthin wird in NaOH gelöst. Durchleiten von CO_2 bis Ausflockung des Xanthins und $p_H = 7{,}8$. Wiederholtes Zentrifugieren und Waschen, Dekantieren. Rückstand in Periston suspendieren. 100 mg in 1 cm³ Periston. Die Flüssigkeit war milchig, die Suspension hielt sich aber gut genug, um genau zu dosieren.

In Gruppe A von 5 Tieren wurde zuerst 50 mg Xanthin je 100 g Gewicht gegeben, am nächsten Tage erfolgte die Vergiftung mit 1 cm³/kg Tetra subkutan. Die Gruppe B erhielt nur Tetra, 8 Tage später erfolgte die zweite Leberfunktionsprüfung.

In der nächsten Phase erhielt die Gruppe A am Tage vor der Vergiftung 100 mg/100 g Xanthin.

Nach einer neuen Funktionsprüfung erfolgten bei Gruppe A in 6 aufeinanderfolgenden Tagen Gaben von Xanthin (100 mg) und 1 cm³ Tetra, von jedem also 3 Injektionen, während die Kontrollen nur 3mal Tetra erhielten. Jetzt erfolgte die dritte Leberfunktionsprobe.

Die Resultate ergibt folgende Tabelle (Prozent p-Oxyphenylbrenztraubensäure nach 30 mg Belastung).

	A	B
Normalwert . .	5,0	5,7
1. Prüfung . .	11,0	6,7
2. Prüfung . .	6,6	11,3
3. Prüfung . .	9,3	13,3

Auffällig ist der bei Gruppe A aus der Reihe schlagende Wert nach der ersten Prüfung. Das können wir durch Abszesse motivieren, die sich durch die Xanthininjektion entwickelten, die durch ein ursprüngliches Verfahren der Herstellung von Xanthinsuspensionen (Lösen in Lauge und Neutralisieren mit HCl) bedingt waren. Felix[19] hat auch bei seinen Versuchen gefunden, daß die Umsetzung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure am Menschen durch eitrige Prozesse leidet. Im ganzen wird man aus den Versuchen Andeutungen in der nach den Versuchen von Forbes[18] zu erwartenden Richtung ersehen können. Die an sich nur schwer zu erhaltende quantitative Darstellung histologischer Befunde zeigte hier Andeutungen, aber bei weitem nicht die von Forbes beschriebenen Unterschiede, obwohl wir unsere Vergiftung nicht so weit führten.

[19] Felix, K.: Hoppe-Seylers Z. 281, 36 (1944).

Zusammenfassung.

Versuche wurden unternommen, um einen Schutz der Leber von Ratten gegen Vergiftungen mit Trinitrotoluol und Tetrachlorkohlenstoff aufzufinden. Als Test diente uns in erster Linie die Belastungsprobe nach Felix und Teske mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Wir prüften als Medikamente vorwiegend Pflanzen, die in der Volksmedizin und Homöopathie als Mittel gegen Leberkrankheiten verschiedener Art angegeben wurden.

1. Mit Chelidonium majus: Schöllkraut, wurden die umfangreichsten Experimente ausgeführt, ohne daß es gelungen wäre, irgendeinen therapeutischen Effekt aufzufinden. Dagegen ließ sich bei häufiger und langdauernder Behandlung aber eine Schädigung finden, die auch histologisch in Erscheinung trat.

2. Benediktendistel (Carduus benedictus) führte zu keinem Erfolg.

3. Auch mit Chelone glabra ließ sich nichts erreichen.

4. Dagegen ließ sich ein günstiger Effekt bei der Mariendistel (Carduus Marianus) nachweisen, und zwar hinsichtlich der Felixschen Probe bei der Vergiftung mit Trinitrotoluol, bei diesem und Tetrachlorkohlenstoff war der Gehalt des Serums an Bilirubin niedriger als ohne Behandlung. Histologisch ließ sich kein günstiger Effekt sehen.

5. Xanthin hatte auch eine günstige Wirkung, die sich in der Probe mit p-Oxyphenylbrenztraubensäure aber kaum histologisch zeigte.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn.

Über die erregende Wirkung von Barbitursäureabkömmlingen und ihre Beeinflussung durch Strychnin, Pervitin und Cardiazol.

Von

Hans Haas und Hans Friedrich Zipf.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. August 1948.)

Neben ihren lähmenden Eigenschaften können die Narkotika unter Umständen auch erregende Wirkungen entfalten. Diese sind experimentell vor allem bei der Anwendung geringer Narkotikakonzentrationen nachzuweisen.

So fanden z. B. Woker und Weyland[1], Nagai[2] und Löhner[3] eine Steigerung der Aktivität einzelliger Organismen und Vouk[4] eine Beschleunigung der Protoplasmaströmung an Plasmodien. Josing[5] konnte das gleiche Phänomen an Pflanzenzellen beobachten.

Außerdem ist bekannt, daß die Narkotika einen Einfluß auf die Permeabilität besitzen, der sich im Bereich mittlerer Konzentrationen im Sinne einer reversiblen Permeabilitätsminderung äußert.

Bei der Untersuchung verschiedener Alkohole durch Schmerl[6] hat sich zeigen lassen, daß geringe Konzentrationen von Narkotika eine Permeabilitätssteigerung bewirken. Die gleichen Befunde konnten später durch Biskupski[7] und Gerstner[8] für Alkohol und Chloroform reproduziert werden. Ebenso wirken nach Hofmann[9] zahlreiche Schlafmittel im Bereich niederer Dosen permeabilitätsfördernd. Es handelt sich also offenbar um einen allgemeinen Effekt, der für alle Narkotika als charakteristisch gelten darf. Selbst in Modellversuchen an Muskelbrei (Dette[10]) bzw. künstlichen Wasserölgrenzflächen (Seelich[11]) tritt unter der Einwirkung geringer Narkotikakonzentrationen eine Quellungszunahme bzw. Senkung der Grenzflächenspannung ein, die als Ausdruck einer Hydratationssteigerung und damit Permeabilitätserhöhung anzusehen ist.

Bei seinen Studien über das psychogalvanische Reflexphänomen konnte Gildemeister[12] nachweisen, daß eine Erregung der Zelle zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Zellengrenzflächen führt. Ähnlich sprechen auch die Befunde von Peseriko[13], Embden[14] und Ebbecke[15] dafür, daß im Erregungszustand die Permeabilität vergrößert ist.

Man darf daher wohl umgekehrt mit einer gewissen Berechtigung aus dem Auftreten und dem Nachweis einer reversiblen Durchlässigkeitssteigerung im Bereich niederer Narkotikakonzentrationen auf das Vorliegen einer erregenden Wirkung schließen.

Am Zentralnervensystem ist dieses Erregungsstadium im Anfang der Narkose ebenfalls bekannt. So fanden Efron[16] und Tuttle[17] eine Steigerung der Patellarreflexe nach Alkoholzufuhr. Kärber und Lendle[18] sahen beim Warmblütler

durch Äther eine Atmungserregung eintreten und Breyer[19] beschrieb eine Zunahme der Bewegungsvorgänge am Flimmerepithel.

Speziell für die Gruppe der Barbitursäurederivate wurden von Lévy[20] Erregungserscheinungen an Meerfischen und von Kaer und Loewe[21] an Meerschweinchen beobachtet. Außerdem berichten Hirschfelder und Rice[22] sowie Wiki[23], daß bei Barbitursäurezufuhr die Erregbarkeit erhöht sein kann und unter Umständen Erregungserscheinungen auftreten. Bei chronischer Zufuhr bewirken selbst Veronal und Luminal am Hund leichte Erregung und Reflexsteigerung (Krautwald und Oettel[24]). Noch stärker wirkt am gleichen Versuchstier Noctal, dessen erregende Wirkung sich bis zur Krampfbereitschaft steigern kann. Auch Silver[25] ist der offensichtliche Widerspruch zwischen tiefem Schlaf und gesteigerter Reaktionsfähigkeit auf schmerzhafte Reize nach Luminal und Pernocton bekannt; diese beiden Mittel führen beim Kaninchen ebenfalls zu einer motorischen Übererregbarkeit. Das gleiche gilt für die Ratte, bei der Noctal und Pernocton die Motorik stark beeinflussen (Vogt[26]). Selbst im narkotischen Stadium rufen leichte Reize noch klonische Zuckungen hervor.

Alle diese Beobachtungen enthalten aber keine quantitativen Angaben über das Ausmaß der motorischen Erregung. Es ist außerdem nicht ersichtlich, an welche Dosierungsbereiche bei den Barbitursäurepräparaten die Erregung vor allem gebunden ist. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe des Zitterkäfigs an der Maus 4 Barbitursäurederivate in bezug auf ihre erregenden Eigenschaften genauer abzugrenzen. Neben Luminal, Medinal und Eunarkon wurde Pernocton geprüft, das nach klinischen Erfahrungen häufig von Erregungssymptomen begleitet ist. Einige Kliniker wie Hirsch, Haberer und Schneider[27] lehnen wegen der Unruhe der Patienten sogar die Pernoctonnarkose ab.

Luminal (Phenyläthylbarbitursäure) und Medinal (Natriumsalz der Diäthylbarbitursäure) sind chemisch nahe miteinander verwandt. Auch hinsichtlich des Wirkungsbildes sowie des Wirkungseintritts und der Wirkungsdauer sind diese beiden Substanzen einander ähnlich. Eunarcon (Natriumsalz der N-Methyl-isopropyl-β-bromallylbarbitursäure) ist sowohl chemisch wie auch hinsichtlich des Wirkungscharakters mit dem Pernocton (Natriumsalz der sec. Butyl-β-bromallylbarbitursäure) in etwa zu vergleichen.

Zur besseren Kennzeichnung der erregungssteigernden Wirkungskomponenten wurden in ergänzenden Versuchsreihen die Narkotika mit Strychnin, Pervitin bzw. Cardiazol kombiniert. Bekanntlich wirken alle diese Analeptika antagonistisch auf die Narkotika. Umgekehrt können auch die Narkotika die erregenden Wirkungen des Cardiazols, Pervitins und Strychnins beeinflussen. Nach Jarisch[28] tritt bei der Vorbehandlung mit Barbitursäurepräparaten, wenn man diese in kleinen Dosen verabreicht, die Strychninerregung besonders deutlich in Erscheinung. Dies zeigt sich vor allem in einem verstärkten Auftreten des Startreflexes, der nach Strychnin bei gleichzeitiger

Einwirkung von Narkotika durch akustische Reize leichter auslösbar ist und sich im Zitterkäfigversuch besonders deutlich zu erkennen gibt. Unter dem Einfluß unterschwelliger Gaben von Analeptika sind demnach unter Umständen die erregenden Wirkungen der Barbitursäurepräparate besser zu verdeutlichen.

Methodik.

Die Versuche wurden an weißen Mäusen durchgeführt. Die Zufuhr der Substanzen erfolgte durch subkutane Injektion. Diese löst anfänglich unter Umständen örtliche Reizwirkungen aus. Bei der Auswertung der Kurven wurden deshalb die ersten 5 Min. nicht berücksichtigt. Zur Registrierung der Erregungslage wurde der Zitterkäfig in Anlehnung an die Versuche von Leuwens[29], Hauschild[30] und Irrgang[31] benutzt. Um eine gleichmäßige Ausbalancierung des Zitterkäfigs zu garantieren, wurde als Aufhängevorrichtung eine Federzugwaage mit einer maximalen Belastungsmöglichkeit bis zu 100 g gewählt. Diese trug den Zitterkäfig und eine Gewichtsschale, durch die eine gleichmäßige Belastung der Feder trotz verschiedener Tiergewichte einzuhalten war. Es standen jeweils 3 Käfige mit je 1 Tier gleichzeitig im Versuch. Die Versuchsanordnung war so empfindlich, daß selbst kleinste motorische Vorgänge wie Putzen und Wischen der Schnauze erfaßt wurden. Ataktische Erscheinungen, klonische Krämpfe und Seitenlage der Tiere wurden in den Protokollen besonders gekennzeichnet. Beim Strychnin wurde außerdem der Startreflex nach Cushny[32] geprüft, der durch Zusammenschlagen voh zwei Metallstäben ausgelöst wurde.

Für die Beurteilung des Verhaltens der normalen Motorik und der Abweichung von der Norm waren wir in Ermangelung eines Impulssammlers auf eine vergleichende direkte Betrachtung der Kurven angewiesen. Trotzdem lassen sich, wie die mehrfache Auswertung der Kurven durch 4 verschiedene Personen unabhängig voneinander ergab, auf diese Weise gewisse objektive Gesichtspunkte für die Beurteilung der Kurven gewinnen, die es gestatten, im Vergleich zur Ausgangslage das Ausmaß der motorischen Erregungslage auszuwerten. Im einzelnen wurden für die Auswertung der Kurven folgende Erregungsgrade zugrunde gelegt.

1 = schwache, aber erkennbare Steigerung der Motorik; 2 = deutlich erkennbare Steigerung der Motorik; 3 = sehr stark ausgeprägte Steigerung der Motorik; 4 = gesteigerte Motorik mit Zuckungen und leichten klonischen Krämpfen; 5 = stark gesteigerte Motorik mit heftigen klonischen Krämpfen.

Experimentelle Untersuchungen.

Die Einzelheiten der verschiedenen Versuchsserien sind aus den Tabellen zu entnehmen. Der leichteren Übersicht halber erfolgen alle Angaben mit Ausnahme des Erregungsgrades in Prozent, obwohl dieses Vorgehen in Anbetracht der geringen Tierzahlen eigentlich nicht zulässig ist. Durchschnittlich standen 9 Tiere im Versuch. In einzelnen Versuchsreihen wurden jeweils nur 6 Tiere benutzt.

Versuche mit Strychnin, Pervitin und Cardiazol.

Beim *Strychnin* ist das Wirkungsbild gekennzeichnet durch spontane Zuckungen und Schreckhaftigkeit der Tiere. Der Wirkungseintritt

Tabelle 1.

Dosis mg/10 g	Erregte Tiere %	Erregungsgrad	Krämpfe %	Mortalität %
		Strychnin nitric.		
0,006	30	1	—	—
0,008	30	1	—	—
0,01	10	1	—	—
0,012	10	1	20	20
		Pervitin		
0,005	25	2	—	—
0,01	50	2	—	—
0,02	70	2 und 3	—	—
		Cardiazol		
0,35	25	1	—	—
0,5	30	1	—	—
0,8	70	1 und 2	—	—
0,9	70	1 und 2	—	—

liegt bei allen Dosen zwischen 5—10 Min. Nach Auslösen des Startreflexes reagieren die Tiere mit heftigem Zusammenfahren und Aufspringen (s. Abb. 1). Höhere Gaben lösen Tetanus aus. 2 von 9 Tieren starben nach subkutaner Injektion von 0,012 mg/10 g unter typischen Strychninkrämpfen.

In der Literatur finden sich stark variable Angaben für die tödlichen Dosen. Nach Falk[33] liegen sie bei subkutaner Applikation für die Maus je nach Alter zwischen 0,005—0,0125 mg/10 g. Sollmann[34] gibt 0,015 mg/10 g als letale Dosis an.

Im Zitterkäfigversuch ermittelte Hauschild[30] als minimal erregende *Pervitindosis* bei der Maus eine Gabe von 0,01—0,02 mg/10 g. Selbst noch kleinere Dosen können bei einzelnen Tieren schon Erregungserscheinungen und eine Verbreiterung des Kurvenbildes herbeiführen. Die Streuung der Versuchsergebnisse ist aber bei diesen kleinen Dosen erheblich. Besser reproduzierbare Werte sind erst mit einer Gabe von 0,01 mg/10 g zu gewinnen. In dieser Dosis ruft Pervitin bei etwa der Hälfte der Tiere vermehrten Bewegungstrieb, Unruhe und anhaltende Putzsucht hervor. Diese Bewegungen lassen sich im Kurvenbild durch kleinere oder größere Ausschläge deutlich erkennen*. Die Wirkung beginnt nach wenigen Minuten einzusetzen und dauert durchschnittlich etwa 20 Min.

Die krampferregende Dosis des *Cardiazols* liegt nach Zipf, Windschus und Kokoschka[35] für die Maus bei 0,45 mg. Diese Dosis genügt in den eigenen Versuchen nur zur Auslösung einer geringgradigen

* Eine entsprechende Abbildung findet sich bei Hauschild: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 470.

motorischen Übererregbarkeit, die sich im Zitterkäfig erst nach der Zufuhr von 0,8—0,9 mg Cardiazol deutlich nachweisen läßt. Die Kurvenbilder gleichen dem des Pervitins. Der Wirkungseintritt liegt zwischen 3—8 Min. Die Wirkungsdauer beträgt 7—16 Min.

Die Spontanmotilität ist beim Strychnin trotz der relativ hohen Dosierung auffallend wenig gesteigert. Dies erklärt sich aus dem Wirkungsbild, bei dem die Einzelzuckungen vorherrschen und ein anhaltender vermehrter Bewegungsstrich meistens fortfällt. Beim Auslösen des Startreflexes ist bei niederen Gaben teilweise eine gewisse Zunahme der spontanen Motilität zu vermerken.

Auch beim Pervitin und Cardiazol steigert sich die Motorik nur in mäßigem oder höchstens mittlerem Ausmaße. Allerdings ist der gewählte Dosierungsbereich bei den Analeptika zu eng begrenzt, um genügende Unterlagen für eine vergleichende Beurteilung zu bieten.

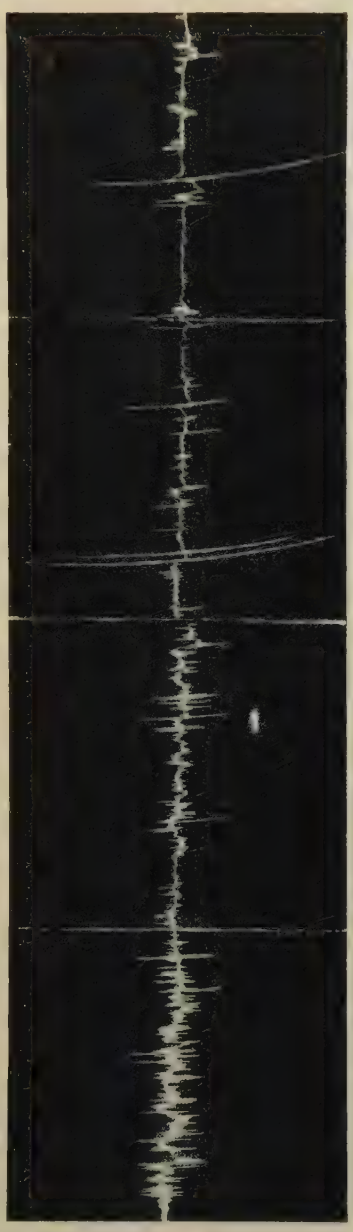


Abb. 1. Strychnin. nitric. Injektion: 0,012 mg/10 g Strychnin. sulfur. subc. Erstes Viertel: Ausgangslage; Versuch 69 — Maus — 33 g.

Es wurden absichtlich bei den Analeptika nur solche Dosen gewählt, die schwache motorische Effekte auslösen. Beim Cardiazol und Pervitin ist dabei die untere Grenzdosis erreicht. Die Strychnindosen bewegen sich dagegen

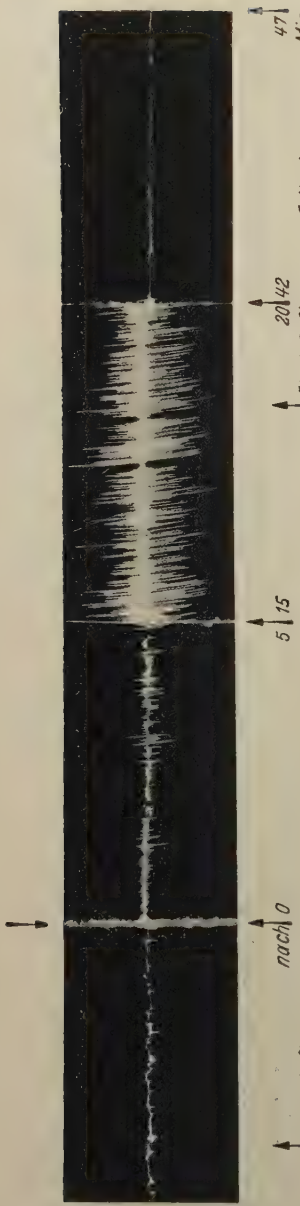


Abb. 2. Luminal. Injektion: 0,7 mg/10 g Luminal-Natrium subc. Erstes Viertel: Ausgangslage; Versuch 14 — Maus — 25 g.

sicherlich an der Grenze des toxischen Bereiches. Sie liegen somit weit höher als die gewählten Cardiazol- und Pervitingaben. Bei den Kombinationseffekten mit den verschiedenen Barbitursäurepräparaten darf man daher nur die Ergebnisse der Einzelversuchsreihen mit Strychnin, Cardiazol oder Pervitin — jede für sich — vergleichend beurteilen, da nur bei jedem einzelnen dieser Gifte gleichartige Versuchsbedingungen vorliegen.

Versuche mit Barbitursäurederivaten.

Die vier geprüften Barbitursäurederivate *Luminal*, *Medinal*, *Pernocton* und *Eunarcon* lösen sämtliche an der Maus eine gesteigerte Motorik aus. Dies ist im Zitterkäfig deutlich zu erkennen. Als Beispiele sind je eine Kurve für Luminal und Pernocton beigefügt (s. Abb. 2 und 3). Der Wirkungseintritt liegt bei Medinal und Luminal zwischen 10 und 20 Min. und bei Pernocton und Eunarcon zwischen 3 bis 6 Min. Das Erregungsstadium hält beim Luminal durchschnittlich 20—36 Min. an; bei Medinal dauert es 15—20 Min. Beim Pernocton schwankt die Erregungsphase um eine Dauer von 6—12 Min. und beim Eunarcon wurde meist eine gesteigerte Motorik über 14—19 Min. beobachtet. Anschließend folgt ein Stadium, in dem sich die Tiere auffallend ruhig verhalten, so daß die Kurve im Zitterkäfigversuch gradlinig verläuft. Bei höheren Dosen tritt zum Teil Seitenlage ein.

Eine mittlere Seitenlagendosis läßt sich aus den vorliegenden Versuchsreihen nur für Pernocton und Eunarcon ermitteln. Sie berechnet sich unter Anwendung der Kärberschen Formel bei beiden Narkotika auf 0,53 bzw. 0,57 mg/10 g Maus. Nach Boedecker und Ludwig[36] bewirken 0,5 mg Pernocton/10 g Maus Seitenlage bei subkutaner Zufuhr. Bei Veronal liegt die Seitenlagendosis nach Pohle[37] bei gleicher

Applikationsform für die Maus zwischen 2,5—3,5 mg/10 g. Beim Luminal und Medinal kamen nur einige Tiere in Seitenlage. Die volle Seitenlagendosis wurde mit den benutzten Mengen nicht erreicht.

Die Anzahl der Tiere, die Erregungssymptome aufweisen, steigt bei den Barbitursäurepräparaten in der Regel mit der Vergrößerung der Dosis. Nur beim Luminal ist diese Gesetzmäßigkeit nicht festzustellen.

Im mittleren Dosierungsbereich von 0,7—0,8 mg/10 g zeigen die meisten Tiere eine gesteigerte Motorik. Entsprechend finden sich bei dieser Luminaldosierung auch die stärksten Erregungssymptome.

Bei den übrigen Barbitursäurederivaten steigt der Erregungsgrad von einer bestimmten Dosis gleichzeitig mit der Anzahl der betroffenen Tiere erheblich an. Besonders starke Erregungserscheinungen wurden beim Eunarcon beobachtet. In der höchsten angewandten Dosierung löste es sogar bei 2 von 9 Tieren Krämpfe aus.

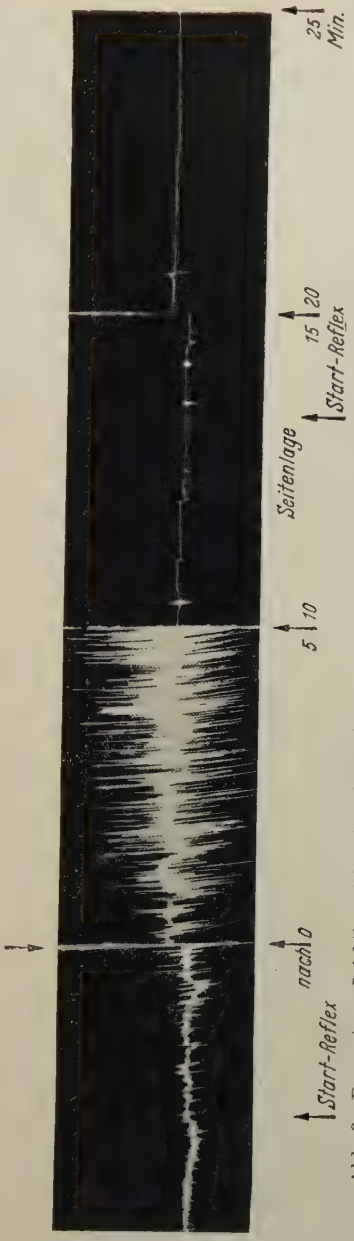


Abb. 3. Pernocton. Injektion: 0,8 mg/10 g Pernocton subc. Erstes Viertel: Ausgangslage; Versuch 11a — Maus — 15 g.

Versuche mit Barbitursäurederivaten und Analeptika.

Führt man gleichzeitig mit den Narkotika *Strychnin* subkutan zu, so kommt im allgemeinen, besonders aber bei höheren Strychningaben, eine Änderung des Wirkungsbildes zustande. Zusätzlich zu der gesteigerten Motorik setzen die typischen Strychninzuckungen ein. Teilweise treten sogar Krämpfe in Form des Strychnintetanus auf. Auch die Auslösung des Startreflexes wird bei der Strychninzugabe vielfach stärker beantwortet als nach alleiniger Zufuhr der Narkotika, die auf den Startreflex keinen Einfluß ausüben. Das motorische Erregungsbild ist aber

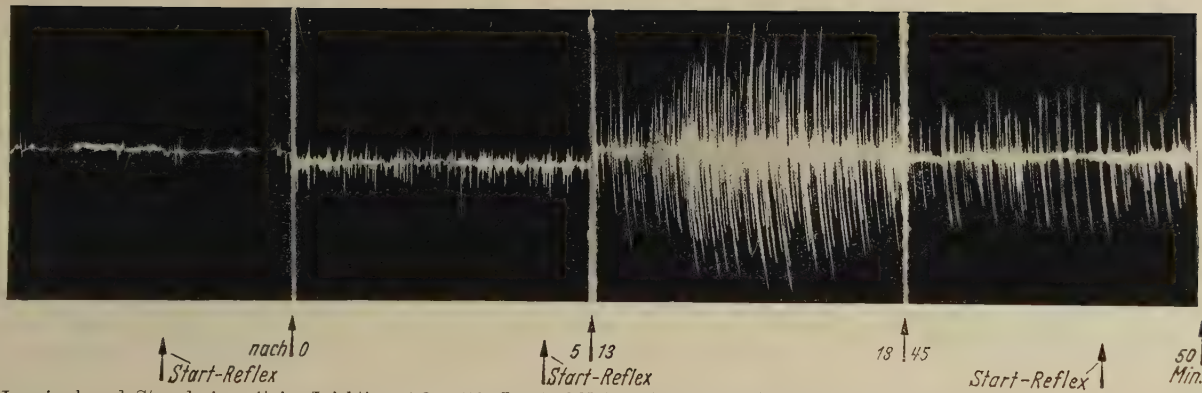


Abb. 4. Luminal und Strychnin. nitric. Injektion: 1,2 mg/10 g Luminal-Natr. subc. 0,006 mg/10 g Strychn. sulfur. subc: Erstes Viertel: Ausgangslage; Versuch 33 — Maus — 18 g.

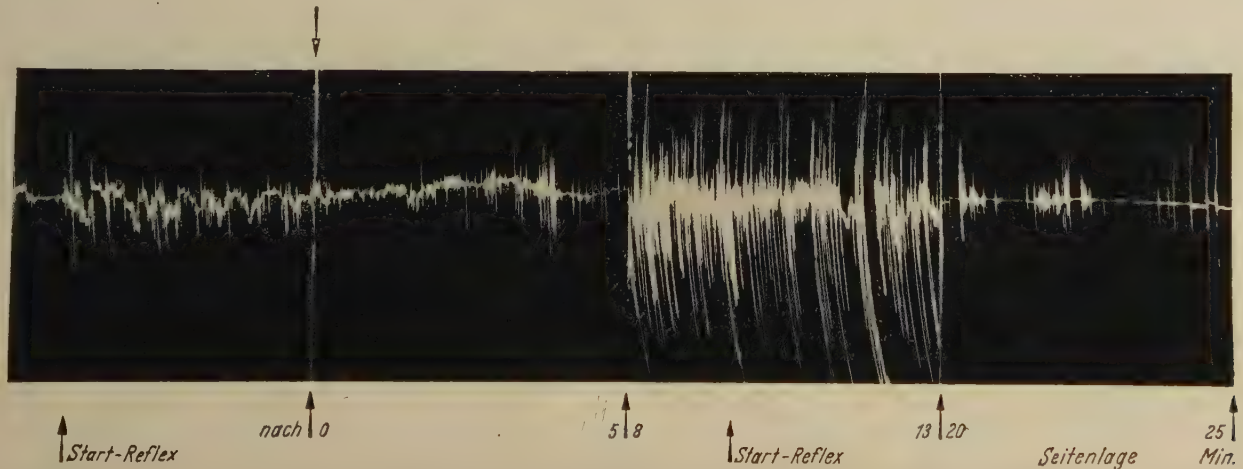


Abb. 5. Pernocton und Strychnin. nitric. Injektion: 0,8 mg/10 g Pernocton subc. 0,006 mg/10 g Strychn. sulfur. subc. Erstes Viertel: Ausgangslage; Versuch 110 — Maus — 25 g.

durchschnittlich schon unabhängig vom Startreflex so hochgradig ausgeprägt, daß die Reaktionen auf den sensiblen Reiz auf den Kurven in dem allgemeinen Erregungsbild verschwinden. Die Zeiten, in denen die Motorik gesteigert ist, fallen bei der Berechnung der Durchschnittswerte etwa mit denen ohne Strychninzugabe zusammen. Einzelne Tiere weisen über wesentlich längere Zeiträume Erregungssymptome auf (s. Abb. 4 und 5).

Die Anzahl der erregten Tiere ist bei der Zugabe von Strychnin meistens gegenüber den Kontrollversuchen mit alleiniger Zufuhr des betreffenden Narkotikums gesteigert. Daneben nimmt auch der Erregungsgrad zu. Dies äußert sich im Anstieg der Durchschnittswerte für jede einzelne Versuchsreihe.

Bei Pernocton und Luminal wurden außerdem für die höchste gewählte Dosis dieser Narkotika jeweils die kleinsten wirksamen Strychninmengen ausgetestet, die noch eine Zunahme der motorischen Erregungserscheinungen bewirken. Diese Versuche sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß beim Luminal in einer Dosis von 1,2 mg 8 γ Strychnin deutlich wirken und den Luminaleffekt verstärken. Beim Pernocton (0,8 mg/10 g) reichen schon 4 γ Strychnin aus, um die Erregbarkeit der Tiere sicher zu beeinflussen. Außerdem treten hier in beträchtlichem Umfange Krämpfe und tetanische Anfälle auf.

Tabelle 2. *Medinal.*

Dosis mg/10 g		Erregte Tiere %	Erregungsgrad	Krämpfe %	Seitenlage %
			Medinal		
0,8	—	45	1	—	—
1,2	—	30	1	—	—
1,6	—	90	2 und 3	—	—
2,0	—	90	2 und 3	—	10
2,4	—	100	3	—	20
			Medinal Strychnin		
0,8	0,01	70	2 und 3	—	—
1,6	0,01	100	3	—	—
2,0	0,01	100	3 und 4	50	—
			Medinal Pervitin		
0,8	0,1	80	2	—	—
1,6	0,1	100	3 und 4	10	—
2,0	0,1	100	4	20	—
			Medinal Cardiazol		
0,8	0,35	50	1 und 2	—	—
1,6	0,35	50	1 und 2	—	—
2,0	0,35	70	2 und 3	—	—

Durch die Zugabe von *Pervitin* ändert sich bei den Barbitursäurederivaten das allgemeine Wirkungsbild nicht. Das Kurvenbild läuft demnach gleichartig ab, wie bei alleiniger Injektion der Narkotika. Die Erregungssymptome sind aber unter der Pervitineinwirkung durchschnittlich wesentlich kräftiger ausgeprägt. Dies zeigt sich auch in dem häufigen Auftreten klonischer Krämpfe, die lediglich beim Luminal nicht in Erscheinung treten. In diesem Falle wird die Dauer des Erregungsstadiums nicht beeinflußt. Bei den anderen Barbitursäurepräparaten hält die Erregung unter Pervitin meist etwas länger an. Erhebliche Zeitunterschiede sind aber nicht festzustellen.

Dem entspricht, daß beim Luminal nur in höchster Dosierung die Erregungslage durch Pervitin eine Steigerung erfährt. Im übrigen liegen die Zahlenwerte beim Luminal sowohl hinsichtlich der Anzahl

Tabelle 3. *Luminal.*

Dosis mg/10 g		Erregte Tiere %	Erregungsgrad	Krämpfe %	Seitenlage %
			Luminal		
0,4	—	70	1	—	—
0,5	—	70	1 und 2	—	—
0,6	—	50	1	—	10
0,7	—	90	2	—	10
0,8	—	80	2	—	10
0,9	—	70	1 und 2	—	20
1,0	—	60	1 und 2	—	25
1,2	—	70	1 und 2	—	40
			Luminal Strychnin		
0,5	0,008	50	1	—	—
0,7	0,008	45	1	—	—
1,0	0,008	90	2 und 3	—	10
1,2	0,008	90	3 und 4	10	30
0,5	0,01	50	1	—	—
0,7	0,01	30	1 und 2	—	20
1,0	0,01	90	2 und 3	—	10
1,2	0,01	90	3 und 4	10	80
			Luminal Pervitin		
0,4	0,1	45	1	—	—
0,6	0,1	45	1	—	—
0,8	0,1	75	1 und 2	—	—
1,0	0,1	100	3	—	—
			Luminal Cardiazol		
0,4	0,35	70	1	—	—
0,6	0,35	45	1	—	—
0,8	0,35	80	1 und 2	—	—
1,0	0,35	50	1 und 2	—	—
0,8	0,5	80	1 und 2	—	—
0,4	0,5	50	1	—	—
0,6	0,5	45	1	—	—
0,8	0,5	80	1 und 2	—	—
1,0	0,5	30	1 und 2	—	—

Tabelle 4. *Pernocton.*

Dosis mg/10 g		Erregte Tiere %	Erregungsgrad	Krämpfe %	Seitenlage %
		Pernocton			
0,2	—	20	1	—	—
0,4	—	45	1	—	45
0,6	—	90	1 und 2	—	50
0,8	—	90	2	—	70
		Pernocton Strychnin			
0,2	0,008	60	1	—	—
0,4	0,008	100	3	—	20
0,6	0,008	90	3 und 4	45	10
0,8	0,008	100	4 und 5	80	—
0,2	0,01	50	2 und 3	—	20
0,4	0,01	100	3 und 4	50	30
0,6	0,01	100	4 und 5	70	10
0,8	0,01	100	5	100	—
		Pernocton Pervitin			
0,2	0,1	70	1	—	—
0,4	0,1	90	3 und 4	20	20
0,6	0,1	100	4	50	10
0,8	0,1	100	4 und 5	90	20
		Pernocton Cardiazol			
0,2	0,35	10	1	—	—
0,4	0,35	80	2 und 3	—	20
0,5	0,35	100	2 und 3	—	10
0,6	0,35	100	2 und 3	—	30
0,8	0,35	80	3 und 4	30	70

Tabelle 5. *Eunarcon.*

Dosis mg/10 g		Erregte Tiere %	Erregungsgrad	Krämpfe %	Seitenlage %
		Eunarcon			
0,1	—	40	1	—	—
0,2	—	70	2	—	—
0,4	—	80	3 und 4	10	80
0,8	—	100	4	20	80
		Eunarcon Strychnin			
0,1	0,01	30	1	—	—
0,2	0,01	80	2	—	—
0,4	0,01	100	3 und 4	20	—
0,8	0,01	100	5	80	—
		Eunarcon Pervitin			
0,1	0,1	80	3	—	—
0,2	0,1	100	3	—	—
0,4	0,1	100	3 und 4	20	—
0,8	0,1	100	5	100	—
		Eunarcon Cardiazol			
0,1	0,35	50	1	—	—
0,2	0,35	80	2 und 3	—	10
0,4	0,35	100	3 und 4	20	—
0,6	0,35	100	5	100	—

Tabelle 6.

Dosis mg/10 g		Erregte Tiere %	Erregungsgrad	Krämpfe %	Seitenlage %	Mortalität %
			Luminal Strychnin			
1,2	—	70	1 und 2	—	40	—
1,2	0,002	30	1	—	70	—
1,2	0,004	90	2	—	45	—
1,2	0,006	80	2	—	45	—
1,2	0,008	90	3 und 4	10	30	—
1,2	0,01	90	3 und 4	10	80	—
1,2	0,012	70	3 und 4	20	30	20
			Pernocton Strychnin			
0,8	—	90	2	—	70	—
0,8	0,002	80	2 und 3	—	45	—
0,8	0,004	100	3 und 4	70	20	—
0,8	0,006	90	3 und 4	60	20	—
0,8	0,008	100	4 und 5	80	—	—
0,8	0,01	100	5	100	—	—

der betroffenen Tiere als auch hinsichtlich der berechneten mittleren Erregungslage etwa im Bereich der Werte, die mit Luminal allein gefunden werden. Zum Teil fallen sie sogar eher noch darunter. Beim Medinal und besonders bei Pernocton und Eunarcon steigert Pervitin dagegen die spontane Motilität deutlich. Auch die Anzahl der betroffenen Tiere ist unter dem Pervitineinfluß vermehrt.

Ähnlich gilt für *Cardiazol*, daß der allgemeine Wirkungscharakter der Barbitursäuren auf die spontane Motilität nicht verändert wird. Bei Luminal und Medinal ist diese Wirkung unter dem Einfluß der benutzten kleinen Cardiazolgaben sogar eher abgeschwächt. Die Werte für den mittleren Erregungsgrad und für die Anzahl der betroffenen Tiere liegen etwa im Bereich der durch Medinal und Luminal allein bewirkten Ausgangslage. Sie halten sich eher noch ein wenig unterhalb dieser Zahlenangaben. Auch die Dauer der Erregung bleibt unverändert.

Die Wirkung von Eunarcon und Pernocton wird dagegen durch die gleichen Cardiazoldosen deutlich gesteigert, so daß die Erregungslage zunimmt und bei einer großen Anzahl der Tiere klonische Krämpfe auftreten. Nur die Dauer der motorischen Erregungssymptome bleibt unbeeinflußt.

Besprechung der Ergebnisse.

Trägt man die in den Tabellen verzeichneten Werte für den Erregungsgrad als Ordinaten gegen die Dosen der Barbitursäuren als Abszissen kurvenartig auf, so zeigen Pernocton, Eunarcon und Medinal einen ähnlichen Verlauf. Von einem gewissen Dosierungsbereich an

nimmt die erregende Wirkung stark zu. Beim Luminal schwankt dagegen die Erregungslage etwa um einen mittleren Wert, dessen Größenordnung sich auch bei steigender Dosis nicht wesentlich ändert. Hier zeigt sich offenbar ein gewisser Unterschied gegenüber den anderen Barbitursäurederivaten an, zumal die benutzte Dosen, gemessen an der mittleren Seitenlagengabe, bei allen Barbitursäurepräparaten etwa in der gleichen Größenordnung liegen.

Das andersartige Verhalten des Luminals wird noch unterstrichen, wenn man die Kombinationsversuche mit Cardiazol, Pervitin und Strychnin berücksichtigt. Eine Steigerung der Erregungslage läßt sich beim Luminal nur mit Strychnin und Pervitin erreichen, wenn man alle diese Mittel in relativ hoher Dosis subkutan injiziert. Im übrigen wird der Einfluß des Luminals auf die spontane Motilität durch die Zugabe von Cardiazol und Strychnin nicht geändert. Bei allen anderen untersuchten Barbitursäuren findet dagegen eine erhebliche Verschiebung der Erregungslage statt. Pervitin wirkt dabei am stärksten und übertrifft in der Regel das Strychnin und Cardiazol. Dieser Unterschied ist aber aus dem verschiedenartigen Wirkungscharakter bzw. aus den ungleichen Dosierungsverhältnissen zu erklären.

Eine gewisse Parallele zum Luminal findet sich allerdings beim Medinal, da auch bei diesem die Zugabe von Cardiazol zu keinem Anstieg der Erregungslage führt.

Auch bei der Bestimmung der kleinsten Schutzdosis gegen Cardiazol an der Ratte zeigt Luminal eine gewisse Sonderstellung, die in der Größe des Quotienten, berechnet aus der mittleren narkotischen Dosis im Vergleich zur Schutzdosis gegenüber tödliche Cardiazolgaben, zum Ausdruck kommt (Gros und Haas[38]). Dieser Quotient liegt fast bei allen untersuchten Schlafmitteln zwischen 4 und 6. Beim Luminal beträgt er dagegen 10. Diesen abnorm hohen Wert darf man wohl damit in Verbindung bringen, daß dieses Schlafmittel auch nach klinischen Erfahrungen besonders starke sedative Effekte auf die motorischen Zentren ausübt. Pernocton gehört umgekehrt zu den Narkotika mit einem auffallend niederen Quotienten von 2,7. Auch bei Eunarcon ist der Quotient relativ klein und beträgt nur 3,5. Die Schutzwirkung gegenüber erregenden Mitteln ist somit bei diesen beiden Barbitursäurepräparaten, im Vergleich zu ihrer narkotischen Wirkkraft, sehr gering ausgeprägt. Die Ursache ist wohl darin zu suchen, daß diese Mittel selbst eine steigernde Wirkung auf die Reflexerregbarkeit ausüben. Medinal nimmt schließlich eine Mittelstellung ein. Der Quotient aus Seitenlage und kleinster Schutzdosis wurde mit 6 bestimmt. Dem entsprechen auch die Befunde im Zitterkäfigversuch, wo Medinal durch die Zugabe von Cardiazol keine Steigerung des Wirkungsgrades erfährt. Auf das kräftiger dosierte Strychnin bzw. auf Pervitin antwortet es dagegen mit verstärkten motorischen Erregungserscheinungen.

Bei dem Einfluß, den Cardiazol, Pervitin und Strychnin auf die Wirkung der Barbitursäurepräparate ausüben, muß man allerdings bedenken, daß umgekehrt die Narkotika auch die Analeptika gegensinnig beeinflussen. Es ist daher nicht erstaunlich, wenn sich in den

vorliegenden Ergebnissen die Verhältnisse zum Teil etwas verwischen und eine Steigerung des Erregungsgrades durch die Zulage von Analeptika unter Umständen entfällt. Beim Cardiazol muß man zudem die Tatsache berücksichtigen, daß das Cardiazol in unterschwelliger Dosierung verabreicht wurde. Wenn Cardiazol trotzdem bei Eunarcon und Pernocton die Erregungslage steigert, so unterstreicht dies um so mehr die motorisch erregende Wirkung dieser Narkotika.

Offensichtlich ist es nicht gleichgültig, in welchem Verhältnis die Dosen der Barbitursäurepräparate und der Analeptika zueinander stehen, zumal bei der wechselseitigen Beeinflussung eventuell eine Änderung der Resorptionsverhältnisse eine Rolle spielen kann. Zur Beurteilung dieser Frage, wie auch der vergleichenden Bewertung der erregenden Wirkung der einzelnen Analeptika sind aber die vorliegenden Versuchsreihen nicht ausreichend, da sie keine genügend breite Variation für die Analeptikadosierung enthalten.

Zusammenfassung.

In Zitterkäfigversuchen an der Maus läßt sich zeigen, daß die Barbitursäurepräparate Luminal, Medinal, Pernocton und Eunarcon nicht nur eine narkotische Wirkung ausüben, sondern in geeigneter Dosierung auch eine Steigerung der Motorik bewirken. Diese erregende Phase geht dem narkotischen Stadium voraus. Die Stärke des Wirkungsgrades ist bei Medinal, Pernocton und Eunarcon von der Dosis abhängig. Erst bei der Anwendung bestimmter Gaben herrschen anfänglich im Wirkungsbild starke Erregungserscheinungen vor.

Im Gegensatz zu den anderen Barbitursäurepräparaten hält sich die gesteigerte spontane Motilität beim Luminal in dem gesamten geprüften Dosierungsbereich etwa innerhalb der gleichen Größenordnung.

Durch gleichzeitige Zugabe von Cardiazol, Pervitin oder Strychnin lassen sich die motorischen Erregungserscheinungen der Barbitursäuren deutlich steigern. Auch die Anzahl der betroffenen Tiere vergrößert sich unter der Zufuhr geeigneter Analeptikadosen.

Dem Luminal kommt auch hier eine gewisse Sonderstellung zu, da bei ihm Strychnin, Pervitin und Cardiazol im allgemeinen ohne Einfluß auf die Erregungssymptome sind. Medinal nimmt eine Zwischenstellung ein. Nach Zugabe von Cardiazol bleibt die Erregungslage unverändert. Durch Pervitin und Strychnin wird die erregende Wirkung des Medinals dagegen gesteigert.

Literatur.

[1] Woker u. Weyland: Z. allg. Physiol. **16**, 265 (1914). — [2] Nagai: Z. allg. Physiol. **6**, 195 (1907). — [3] Löhner: Z. allg. Physiol. **15**, 199 (1913). —

[4] Vouk: Denkschrift der k. Akademie d. Wiss. Wien, S. 653. 1913. — [5] Josing: Jb. Bot. **36**, 192 (1901). — [6] Schmerl: Unveröffentlichte Versuche. Zit. nach Gildemeister, Bethe-Bergmanns Handbuch, Bd. VIII/2, S. 688. — [7] Biskupski: Pflügers Arch. **240**, 287 (1938). — [8] Gerstner: Pflügers Arch. **244**, 68 (1940). — Naunyn-Schmiedebergs Arch. **193**, 211 (1939). — [9] Hofmann: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **201**, 529 (1943). — [10] Dette: Biochem. Z. **149**, 136 (1924). — [11] Seelich: Pflügers Arch. **243**, 283 (1939/40). — [12] Gildemeister: Pflügers Arch. **200**, 287 (1923). — [13] Peseriko: Boll. Soc. Biol. sper. **1**, 139 (1926). — [14] Embden: Hoppe-Seylers Z. **118**, 1 (1922). — [15] Ebbecke: Pflügers Arch. **195**, 555 (1922). — [16] Efron: Pflügers Arch. **39**, 467 (1885). — [17] Tuttle: J. Pharmacol. (Am.) **23**, 163 (1924). — [18] Kärber u. Lendle: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **160**, 440 (1931). — [19] Breyer: Pflügers Arch. **99**, 481 (1903). — [20] Lévy: C. r. Soc. Biol. **99**, 1325 (1928). Zit. nach Kochmann. — [21] Kaer u. Loewe: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **118**, 109 (1926). — [22] Hirschfelder u. Rice: J. Pharmacol. (Am.) **24**, 449 (1925). — [23] Wiki: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **27**, 117 (1923). — [24] Krautwald u. Oettel: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **186**, 500 (1937). — [25] Silver: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **158**, 219 (1930). — [26] Vogt: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **152**, 355 (1930). — [27] Hirsch u. Haberer: Zit. nach Vogt. Naunyn-Schmiedebergs Arch. **152**, 355 (1930). — [27a] Schneider: Narkose **1928**, 225. — [28] Jarisch: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **117**, 53 (1927); **201**, 161 (1943). — [29] Leuwens: Veröff. 1925. Zit. nach Naunyn-Schmiedebergs Arch. **189**, 288 (1938). — [30] Hauschild: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **191**, 465 (1939). — [31] Irrgang: Fschr. Ther. **1942**, 145. — [32] Cushny: Quart. J. exper. Physiol. **12**, 153 (1920). — [33] Falk: Z. Physiol. **36**, 285 (1885). — [34] Sollmann: Laborat. Guide 1917. — [35] Zipf, Windschus u. Kokoschka: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **185**, 113 (1937). — [36] Boedecker u. Ludwig: Zit. nach Heffters Handbuch, Erg.-Bd. 2, S. 149. — [37] Pohle: Zit. nach Heffters Handbuch, Erg.-Bd. 2, S. 147. — [38] Gros u. Haas: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **182**, 348 (1936).

Berichtigung zu der Arbeit:

Allgemeinwirkungen und Blutbildveränderungen durch Thiouracil und 4-Methylthiouracil*.

Von

Lena Fischer, Rudolf Kopf und Arnold Loeser.

Auf S. 735 ist ein sinnentstellender Fehler unterlaufen: Zeile 2 von unten muß es statt „... zwischen 15000 und 20000" heißen: „... die der Leukocyten liegt um 27000. Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß die Leukocytenwerte recht stark streuen; unsere Tagesmittelwerte für 10 normale Ratten schwanken zwischen 22600 und 31800, Einzelwerte von 12200—55200 wurden beobachtet." Ebenso auf S. 736 Zeile 3 von oben: statt „... Kernverschiebungsindex lag bei 0,72%" setze: „... Kernverschiebungsindex lag bei 0,27."

* Naunyn-Schmiedebergs Arch. 205, 730 (1948).

4IB212t